

## SPECIFICATION

10/086,816

*Field of the Invention*

The present invention relates to a gene involved in the transport of organic anions in the kidney and the polypeptide coded for by that gene.

*Background of the Invention*

The kidneys play an important role in the excretion of foreign substances and drugs from the body. Anionic drugs are excreted into the urine via the proximal renal tubules along a pathway mediated by carriers. The excretion of these kinds of organic anions begins with the influx of organic anions into the tubule cells through their basal membranes from the blood surrounding the tubules.

The influx of organic anions at the basal membrane has been studied in experiments using resected organ perfusion and isolated cell membrane vesicle systems and utilizing p-aminohippuric acid and the like as the organic anion substrate. The results of this research suggested that an organic anion transporter is involved in the influx of organic anions and that the influx of organic anions at the basal membrane is mediated by a transporter that exchanges organic anions and dicarboxylates.

However, it has been impossible to analyze the details of the transport mechanism in the renal tubules, for example, the transport network between transporters and the interactions between drugs in the renal excretion process, using previous methods, and there has been a need to isolate the organic anion transporter gene to enable a detailed analysis of this mechanism.

Various molecular species of the organic anion transporter gene expressed in the liver have been cloned (Hagenbuch et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 88, pg. 10629, 1991; Jacquemin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, pg. 133, 1994). In addition, the cloning of the OCT1 gene, which is one of the organic cation transporters expressed in the kidneys and liver, has been reported (Grundemann, et al., Nature, Vol. 372, pg. 549, 1994).

Furthermore, the cloning of the sodium-dependent dicarboxylate transporter gene (NaDC-1) of the kidney has been reported (Pajor, et al., J. Biol. Chem., Vol. 270, pg. 5779, 1995).

Recently the cloning of the organic anion transporter OAT-K1 gene, which is localized in rat renal tubule, has been reported (Saito, et al., J. Biol. Chem., Vol. 270, pg. 20719, 1996), and this gene is related to the sodium-independent organic anion transporter (oatp)



expressed in rat liver. However, it has not been confirmed that the transport mechanism of OAT-K1 is based on the exchange of organic anions and dicarboxylates.

### *Summary of the Invention*

The object of the present invention is to provide a gene for a novel organic anion transporter involved in the transport of organic anions in the kidney and the organic anion transporter that is the polypeptide coded for by that gene. Other objects of this invention will become clear in the following discussion.

The inventors have cloned the gene of a novel protein from rat kidney cells, and this protein has the capability to transport organic anions. The inventors have also cloned a homologous gene (homolog) in humans. The inventors have completed the present invention by successfully expressing the product of this gene in the ova of *Xenopus laevis* and verifying that it transports organic anions.

More specifically, the present invention is a protein selected from a group consisting of (A), (B), (C) and (D) below.

- (A) The protein comprising the amino acid sequence represented by Sequence No. 1.
- (B) A protein having the capability to transport organic anions and comprising an amino acid sequence derived from Sequence No. 1 by deletion, substitution or addition of one or more amino acid residues.
- (C) The protein comprising the amino acid sequence represented by Sequence No. 2.
- (D) A protein having the capability to transport organic anions and comprising an amino acid sequence derived from Sequence No. 2 by deletion, substitution or addition of one or more amino acid residues.

In addition, the present invention is a gene selected from a group of DNA consisting of (a), (b), (c) and (d) below.

- (a) DNA comprising the base sequence represented by Sequence No. 1.
- (b) DNA that codes for a protein having the capability to transport organic anions and to hybridize with the DNA comprising the base sequence represented by Sequence No. 1 under stringent conditions.
- (c) DNA comprising the base sequence represented by Sequence No. 2.
- (d) DNA that codes for a protein having the capability to transport organic anions and to hybridize with the DNA comprising the base sequence represented by Sequence No. 2 under stringent conditions.



The inventive novel protein that has the capability to transport organic anions, i.e., the organic anion transporter (OAT1: Organic Anion Transporter 1) is expressed mainly in the renal tubules of the body.

The organic anion transport capability (uptake of organic anions into cells in which it is expressed) of the organic anion transporter OAT1 is activated by the presence of dicarboxylates in the cell. Based on this finding, it is thought that this protein is a transporter that exchanges dicarboxylates for organic anions. It is also believed that when this exchange transport occurs, the dicarboxylates expelled from the cell by OAT1 in exchange for the organic anions are taken back into the cells by the sodium-dependent dicarboxylate transporter (NaDC-1) and recycled.

The inventive organic anion transporter OAT1 has an extremely broad range of substrate selectivity, and it has the capability to transport (uptake) cyclic bases, prostaglandins, and uric acid as well as drugs with various different structures such as antibiotics, NSAIDs, diuretics, antitumor drugs and the like.

Furthermore, the inventive organic anion transporter OAT1 is believed to have no homology with the previously reported organic anion transporter OAT-K1 found in rat kidney, and it is thought to be an entirely different molecular species.

#### *Brief Description of the Drawings*

Figure 1 is a graph showing the experimental results of uptake of glutarate by ova injected with cRNA of the rat sodium-dependent dicarboxylate transporter (rNaDC-1) gene.

Figure 2 is a graph showing the experimental results of uptake of p-aminohippuric acid (PAH) by ova injected with mRNA and/or cRNA of the rat NaDC-1 gene from rat kidney tissue.

Figure 3 is a graph showing the hydrophobic plot of the rat organic anionic transporter OAT1.

Figure 4 is a photo of electrophoresis showing the result of analysis of expression of OAT1 gene mRNA in various rat organ tissues by Northern blot.

Figure 5 is a graph showing the results in PAH uptake tests in ova injected with rat OAT1 gene cRNA in which the effect of preincubation with glutarate and the effect of joint expression with rNaDC-1 were investigated.

Figure 6 is a graph showing the results in PAH uptake tests in ova injected with rat OAT1 gene cRNA in which the effect of the addition of NaCl was investigated.



Figure 7 is a graph showing the results in PAH uptake tests in ova injected with rat OAT1 gene cRNA in which the effect of the concentration of PAH substrate was investigated.

Figure 8 is a graph showing the results in PAH uptake tests in ova injected with rat OAT1 gene cRNA in which the effect of the various types of drugs on the system was investigated.

Figure 9 is a graph showing the results of uptake tests in ova injected with rat OAT1 gene cRNA when various species of radioactively labeled drugs were used as substrates.

#### *The Most Preferred Embodiments to Perform the Invention*

Sequence No. 1 in the sequence table below represents the entire length of the cDNA base sequence (approx. 2.2 kbp) of the organic anion transporter (rat OAT1) gene from rat kidney and the amino acid sequence (551 amino acid residues) of the protein coded for by its translating region.

Sequence No. 2 represents the entire length of the cDNA base sequence (approx. 2.2 kbp) of the organic anion transporter (human OAT1) gene from human kidney and the amino acid sequence (563 amino acid residues) of the protein coded for by its translating region.

Homology searches of all sequences contained in known DNA databases (GenBank and EMBL) and protein databases (NBRF and SWISS-PROT) were conducted for the base sequences and amino acid sequences shown in Sequence Nos. 1 and 2 of the sequence table, but no matches were found, and these sequences are believed to be novel.

In addition to proteins having the amino acid sequences represented by Sequence Nos. 1 and 2, the scope of the inventive protein includes, for example, proteins having an amino acid sequence derived from the amino acid sequences represented by Sequence Nos. 1 and 2 by deletion, substitution or addition of one or more amino acid residues. This deletion, substitution or addition shall be such that the organic anion transport capability is retained and shall be normally 1 to approx. 110 residues, preferably 1 to approx. 55 residues. The amino acid sequences of these kinds of proteins shall normally have 80% or more, preferably 90% or more, homology with the amino acid sequences represented by Sequence Nos. 1 and 2.

In addition to genes containing the DNA having base sequences represented by Sequence Nos. 1 and 2, the scope of the inventive gene includes, for example, genes containing DNA that can hybridize under stringent conditions with the DNA having the base sequences represented by Sequence Nos. 1 and 2. This hybridizing DNA may be any DNA such that the protein that it codes for has the capability to transport organic anions. The base sequence of this DNA shall normally have 70% or more, preferably 80% or more, homology with the base sequences of the DNA represented by Sequence Nos. 1 and 2. This kind of DNA shall include mutant genes expressed in nature, mutant genes produced by intentional mutation, homologous genes derived from other species of organisms and the like.





In the present invention, hybridization under stringent conditions may be performed under conventional stringent conditions (low stringent conditions) in which hybridization is conducted in a hybridization solution of 5xSSC or an equivalent salt concentration at 37° to 42°C for approximately 12 hr, a pre-rinse is performed as needed using a solution of 5xSSC or an equivalent salt concentration, and a rinse is performed in a solution of 1xSSC or an equivalent salt concentration. On the other hand, hybridization may also be performed under conditions having a higher level of stringency (high stringent conditions) in which the rinse is performed in a solution of 0.1xSSC or an equivalent salt concentration.

The inventive organic anion transporter gene can be isolated by screening using suitable mammalian kidney tissues and cells as a gene source. Such mammals may include non-human animals such as dog, cow, horse, goat, sheep, monkey, pig, rabbit, rat, mouse, and the like as well as humans.

The screening and isolation of the gene is optimally performed using expression cloning and the like.

For example, using rat kidney tissue as a gene source, mRNA [poly (A)<sup>+</sup> RNA] is prepared. This mRNA is fractionated, and each fraction is introduced into ova of *Xenopus laevis* together with the cRNA of the rat sodium-dependent dicarboxylate transporter (rNaDC-1).

Because the cDNA of the NaDC-1 gene has already been reported, (Pajor et al., J. Biol. Chem., Vol. 270, pg. 5779, 1995), the cDNA of the NaDC-1 gene can easily be obtained by a method such as PCR. Complimentary RNA (cRNA) (capped) can be synthesized from the NaDC-1 cDNA using T3 or T7 RNA polymerase and the like.

In the ova in which the mRNA and NaDC-1 cRNA have been introduced, the OAT1 mRNA can be concentrated by measuring the transport (uptake) of substrate into the cells using, for example, PAH and the like as a substrate (organic anion) and selecting the mRNA fraction that exhibits the highest uptake. A cDNA library is then prepared based on this concentrated mRNA. cRNA (capped) is prepared from the cDNA of the library, and each clone is introduced into ova together with NaDC-1 cRNA in the manner described above, and a clone containing the OAT1 gene cDNA can be obtained by using substrate uptake activity as an indicator and selecting positive clones.

The amino acid sequence of OAT1 can be determined by determining the base sequence of the cDNA obtained as described above, identifying its translating region, and determining the protein that it codes for, i.e., the OAT1 protein.

The following procedure can be used to demonstrate that the cDNA obtained in the above manner is the cDNA of the organic anion transporter gene, i.e., that the gene product coded for by this cDNA is the organic anion transporter. The cRNA prepared from the cDNA of the OAT1 gene is introduced into ova and expressed, and the transport (uptake)



capability of organic anions into the cells can be confirmed by measuring the uptake of substrate into the cells with a conventional uptake experiment (Kanai and Hediger, *Nature*, Vol., 360, pp. 467-471, 1992) using a suitable organic anion as the substrate in the same manner as described above.

It is also possible to investigate the properties of OAT1, for example, the fact that OAT1 is performing exchange transport with dicarboxylates, the substrate specificity of OAT1, and the like by employing the same kind of uptake experiment on cells that express OAT1.

It is also possible to isolate homologous genes, chromosomal genes and the like from different tissues and different organisms using the cDNA of the OAT1 gene obtained in the above manner by screening a suitable genomic DNA library or cDNA library prepared from a different gene source.

In addition, the gene can be isolated from a cDNA library or genomic DNA library by conventional PCR (Polymerase Chain Reaction) by using a synthetic probe that is designed based on information in the base sequence of the disclosed inventive gene (complete or partial base sequence represented by Sequence Nos. 1 and 2).

A DNA library such as a cDNA library or genomic DNA library can be prepared, for example by the method described in "Molecular Cloning" (Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). A suitable commercially available library may also be used.

The inventive organic anion transporter (OAT1) can be produced by gene recombination technology using, for example, cDNA that codes for the organic anion transporter. For example, DNA (cDNA and the like) that codes for the organic anion transporter can be incorporated into a suitable expression vector, and the resulting recombinant DNA can be inserted into suitable host cells. Expression systems (host-vector systems) for producing polypeptides include expression systems comprising bacteria, yeast, insect cells and mammalian cells. Among these, the use of insect cells and mammalian cells is preferred for obtaining functioning proteins.

For example, for expressing the polypeptide in mammalian cells the DNA that codes for the organic anion transporter can be inserted into a suitable expression vector (for example, a retrovirus vector, papilloma virus vector, vaccinia virus vector, SV40 vector and the like) downstream from a suitable promotor (for example, SV40 promoter, LTR promoter, elongation 1 $\alpha$  promoter and the like) to construct an expression vector. Next, a suitable animal cell is transformed by the expression vector, and the transformant is cultured in a suitable medium to produce the desired polypeptide. Suitable mammalian host cell lines include monkey COS-7 cells, Chinese hamster CHO cells, human HeLa cells, or first passage cells derived from kidney tissue, LLC-PK1 cells derived from porcine kidney, and OK cells derived from opossum kidney.



For the DNA that codes for the OAT1 organic anion transporter, for example, cDNA having a base sequence represented by Sequence Nos. 1 and 2 may be used, but this is not limited to the above cDNA sequence, and it is possible to design DNA corresponding to the amino acid sequence and use it as the DNA that codes for the polypeptide. In that case, some 1-6 codons that code for single amino acids are known, and selection of the codons to be used may be arbitrary, but it is possible to design a sequence with an even higher expression efficiency by taking into consideration the codon usage frequency of the host used for expression. DNA having a designed base sequence can be obtained by chemical synthesis of DNA, fragmentation and ligation of the cDNA described above, or partial modification of the base sequence. Intentional partial modification of the base sequence and introduction of mutations can be performed by site specific mutagenesis (Mark, D. F. et al., Proceedings of National Academy of Sciences, Vol. 81, 1984, pp. 5662-5666) using a primer comprising a synthetic oligonucleotide that codes for the desired modification.

Nucleotides (oligonucleotides and polynucleotides) hybridized under stringent conditions with the inventive organic anion transporter gene can be used as probes to detect the organic anion transporter gene, and they can be used as antisense oligonucleotides, and ribozymes and decoys to modify expression of the organic anion transporter gene. For example, nucleotides containing a partial sequence of 14 or more conventional, continuous bases in the base sequences represented by Sequence Nos. 1 and 2 or their complementary sequences may be used as this kind of nucleotide, and in order to make hybridization more specific, a longer sequence, for example, a sequence of 20 or more, or even 30 or more bases can be used as the partial sequence.

An antibody to the inventive organic anion transporter can be obtained by using the transporter or a polypeptide having immunological equivalence, and the antibody can be used to detect and purify the organic anion transporter. The antibody can be prepared by using the inventive organic anion transporter, a fragment of it, or a synthetic peptide having a partial sequence of it as the antigen. Polyclonal antibodies can be prepared by conventional methods in which a host animal (a rat or rabbit, for example) is inoculated with antigen and the immunoserum is collected. Monoclonal antibodies can be prepared by conventional techniques such as the use of hybridomas.

The present invention is described in greater detail below through examples but the present invention is not limited to these examples.

In the following examples, unless a procedure is specifically described otherwise, the method described in "Molecular Cloning" (Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) was used and when commercial reagents and kits were used, they were used in accordance with the instructions provided with the product.

## EXAMPLES

### *Example 1: Cloning of Rat Organic Anion Transporter*



## (1) Isolation of Rat Dicarboxylate Transporter cDNA and Preparation of cRNA

A cDNA library was prepared from rat poly(A)<sup>+</sup> RNA using a cDNA synthesis kit (SuperScript Choice System, Gibco) and inserted at the EcoR I cleavage sites of lambda-Ziplox (Gibco) phage vectors. Using PCR a segment of the rabbit sodium-dependent dicarboxylate transporter NaDC-1 gene (Pajor, et al., J. Biol. Chem., Vol. 270, pg. 5779, 1995) corresponding to bases 1323-1736 was labeled with <sup>32</sup>P-dCTP, and this was used as a probe for screening of the rat cDNA library. Hybridization was performed overnight in a hybridization solution at 37°C, and the filter film was rinsed with 0.1xSSC/0.1%SDS at 37°C. A solution buffered at pH 6.5 that contained 5xSSC, 3x Denhard's solution, 0.2% SDS, 10% dextran sulfate, 50% formamide, 0.01% Antifoam B (Sigma) (an antifoaming agent), 0.2 mg/mL salmon sperm modified DNA, 2.5 mM sodium pyrophosphate, and 25 mM MES was used for the hybridization solution. The cDNA fragments incorporated into the lambda Ziplox phage were inserted into a pZL1 plasmid and subcloned to a pBluescript II SK- (Stratagene) plasmid for determination of the base sequence.

cRNA (RNA complementary to cDNA) was prepared using T7 RNA polymerase from the plasmid containing the cDNA of the rat dicarboxylate transporter obtained in the above manner.

Following the method of Kanai et al. (Kanai and Hediger, Nature, Vol. 360, 1992, pp. 467-471), the cRNA was injected into the ova of *Xenopus laevis* and an uptake test was performed on these ova using glutarate as the substrate. In the test a radioactively labeled substrate (<sup>14</sup>C-glutarate) was used. To investigate the effect of sodium ions, a solution containing 96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgC<sub>2</sub> and 5 mM HEPES (pH 7.4) was used. To investigate the effect of choline chloride, a solution containing 96 mM choline chloride, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgC<sub>2</sub> and 5 mM HEPES (pH 7.4) was used. To this solution <sup>14</sup>C-glutaric acid was added to a concentration of 1 mM. Ova not injected with RNA were used as controls.

Figure 1 shows the results of this test. As can be clearly seen from Fig. 1, in the choline chloride uptake solution, no uptake of glutarate in either the ova injected with the cRNA of rNaDC-1 or the controls was found. On the other hand, in the sodium uptake solution, a pronounced uptake of glutarate was found in ova injected with the cRNA of rNaDC-1. More specifically, this demonstrates that glutarate uptake is sodium dependent and it confirms that the cloned cDNA is the rat dicarboxylate transporter gene.

## (2) Cloning of the Rat Kidney Organic Anion Transporter OAT1

Following the method of Kanai et al. (Kanai and Hediger, Nature, Vol. 360, 1992, pp. 467-471), the cloning of the rat kidney organic anion transporter was performed by expression cloning as described below.

400 µg fractions of rat kidney poly(A)<sup>+</sup> RNA was isolated by gel electrophoresis.





Each fraction was injected into ova together with the cRNA of the rat dicarboxylate transporter obtained in Step (1) above. The ova had been preincubated for 2 hr in sodium uptake solution (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 5 mM HEPES, pH 7.4) containing 1 mM glutarate as the substrate.

Following the method of Kanai et al. (Kanai and Hediger, Nature, Vol. 360, 1992, pp. 467-471), the substrate uptake test described below was performed on the ova injected with RNA using PAH as the substrate. The ova were incubated for 1 hr in sodium uptake solution that contained <sup>14</sup>C-PAH (50 μM) as the substrate but did not contain glutarate, and the uptake rate of the substrate was measured by counting the radioactivity taken into the cells. As shown in Figure 2, in this system no uptake of PAH was found in ova injected only with rat kidney poly(A)<sup>+</sup> RNA (mRNA), whereas uptake of PAH was observed in ova injected with both rat kidney poly(A)<sup>+</sup> RNA and rat dicarboxylate transporter cRNA. Ova that were not injected with RNA were used as controls.

The fraction that showed the highest PAH uptake rate in the ova injected with RNA was selected from among the RNA fractions that had been obtained. From the poly(A)<sup>+</sup> RNA (1.8-2.4 kb) of this fraction a cDNA library was prepared using cDNA synthesis and a plasmid cloning kit (Superscript Plasmid System, Gibco). These fragments of DNA were inserted at the SAL I and Not I recognition sites of the pSPORT1 plasmid (Gibco), and the recombinant plasmid DNA was introduced into *E. coli* DH10B competent cells (Electro Max DH10B Competent cells, Gibco). The transformants were cultured on nitrocellulose films and approximately 500 colonies/plate were obtained. Plasmid DNA was prepared from these colonies, and the DNA was cleaved by the restriction enzyme Not I. Capped cRNA was synthesized from this DNA by *in vitro* transcription.

The cRNA (approx. 10 ng) was injected into ova together with the cRNA (2 ng) of the rat dicarboxylate transporter obtained in Step (1) above. Screening of the ova for positive clones was performed using the PAH uptake test in the same manner as described above. In the screening process, groups containing DNA extracted from multiple clones was investigated, and if PAH uptake was verified in a particular group, multiple subgroups were formed from that group and further screening was performed.

As a result of screening, 1 positive clone (a clone in which substrate uptake was found in ova injected with cRNA) was isolated from 8000 clones.

For this clone, i.e., the clone containing the cDNA of the rat dicarboxylate transporter OAT 1, the base sequence of the cDNA was determined by the dideoxy method using a deletion clone preparation kit for determining base sequences (Kilo-Sequence Deletion kit, Takara Shuzo), a synthetic primer, and a sequence determination kit (Sequenase ver. 2.0, Amersham).

By this method, the cDNA base sequence of the rat dicarboxylate transporter OAT1 gene was obtained. The cDNA base sequence was analyzed by conventional methods and both the translating region of the cDNA and the amino acid sequence of OAT1 that it codes



for were determined. These sequences are represented by Sequence No. 1 in the sequence table below.

As shown in Figure 3, an analysis of the amino acid sequence of OAT1 by hydrophobic plotting (Kyle-Doolittle hydropathy analysis) predicted 12 membrane-spanning domains. In addition, a site with 5 glycosides attached was predicted to be the initial hydrophilic loop. There were also 4 sites thought to be protein kinase C-dependent phosphorylation sites in the hydrophilic loops of transmembrane domains 6 and 7.

### (3) Expression of the OAT1 Gene in Various Tissues (Analysis by Northern Blotting)

The cDNA of the rat OAT1 gene was labeled over its entire length with  $^{32}\text{P}$ -dCTP, and using this as a probe Northern blotting was performed in the manner described below on RNA extracted from various rat tissues. Electrophoresis was performed on 3  $\mu\text{g}$  of poly(A)<sup>+</sup> RNA in 1% agarose-formaldehyde gel, and transfer was made to a nitrocellulose filter. This filter was hybridized overnight at 42°C in the hybridization solution that contained OAT1 cDNA that had been labeled over its entire length with  $^{32}\text{P}$ -dCTP. The filter was rinsed with 0.1xSSC containing 0.1% SDS at 65°C.

As shown in Figure 4, Northern blotting revealed that in kidney tissue 2 bands were detected, one in the vicinity of 2.4 kb and the other corresponding to 3.9 kb to 4.2 kb, thereby confirming expression. The amount of expressed OAT1 mRNA was large in the cortex and the outer medulla but small in the inner medulla.

In addition, a faint band with long-term photosensitivity was detected in brain tissue in the vicinity of 2.4 kb, but bands were not detected in any of the other tissues and no expression was found.

### (4) Expression of OAT1 Gene in Kidney Tissue (Analysis by In situ Hybridization)

In situ hybridization was performed as follows. After rat kidney tissue was fixed by perfusion with 4% paraformaldehyde, it was diced and further fixed in 4% paraformaldehyde. The rat kidney tissue was then thin-sectioned at 5  $\mu\text{m}$ , and in situ hybridization was performed on the sections.

Using T7 and T3 RNA polymerase,  $^{35}\text{S}$ -labeled sense cRNA and antisense cRNA were synthesized from the entire length of the OAT1 cDNA and used as probes. Hybridization in the sections was performed overnight in the hybridization solution, and the sections were rinsed with 0.1xSSC for 30 min at 37°C.

In situ hybridization revealed that in rat kidney OAT1 mRNA is expressed in the cortex and outer medulla of the kidney, and particularly in the medullary ray tissue. This finding demonstrates that the organic anion transporter OAT1 is most often expressed in the intermediate portions of the proximal tubule.

### *Example 2 Characterizing the Organic Anion Transporter OAT1*



### (1) Effect of Glutarate on Organic Anion Transporter OAT1 Transport Activity

The effect of glutarate and preincubation was investigated in a PAH uptake test in ova injected with rat OAT1 gene cRNA.

The PAH uptake test was performed as follows in accordance with the method described in Example 1 (2) above. Ova injected with rat OAT1 gene cRNA or rat OAT1 gene cRNA and rat NaDC-1 cRNA were incubated for 2 hr in a sodium uptake solution that either did or did not contain 1 mM glutarate. Then  $^{14}\text{C}$ -PAH was added and, after the cells were incubated for 1 hr at room temperature, uptake of the radioactively labeled substrate was measured.

As shown in Figure 5, PAH uptake was increased in ova that had pretreated with 1 mM glutarate. When ova expressing both rat dicarboxylate transporter and OAT1 were pretreated with glutarate, the  $^{14}\text{C}$ -PAH uptake was increased even further. The effect of glutarate demonstrated in these results shows that PAH uptake is dependent on the intracellular concentration of dicarboxylate, and it appears that OAT1 is an exchange transporter for organic anions and dicarboxylates. Ova that had not been injected with RNA were used as controls.

### (2) Chloride Dependency of OAT1 Transport Activity

The effect of chloride added to the liquid culture medium was investigated in a PAH uptake test in ova injected with rat OAT1 gene cRNA.

The PAH uptake test was performed in accordance with Step (1) above using ova injected with rat OAT1 gene cRNA. However, when looking at the effect of the addition of choline chloride as the chloride ion added to the uptake solution, a choline chloride uptake solution identical to that used in Example 1 (1) above was used in place of the sodium uptake solution.

As shown in Figure 6, when choline was substituted for the extracellular sodium, no effect on PAH whatsoever was found. This finding demonstrated that OAT1 is a transporter that is not dependent on sodium ions for activity. Ova that had not been injected with RNA were used as controls.

### (3) Michaelis-Menten Kinetics Experiment with OAT1

A Michaelis-Menten kinetics experiment on the organic anion transporter was performed by investigating changes in PAH uptake rate compared with changes in concentration of the PAH substrate.

The PAH uptake test was conducted in accordance with the method described in Step (1) above using ova that had been injected with rat OAT1 gene cRNA. However, the  $^{14}\text{C}$ -PAH uptake was measured for 3 min. As shown in Figure 7, the  $K_m$  value was approx.



14.3±2.9  $\mu$ M. This  $K_m$  value was about the same as the  $K_m$  value (80  $\mu$ M) of the basal organic anion transport system that had already been reported for the *in vivo* system (Ulrich et al., Am. J. Physiol. Vol. 254, 1988, pp. F453-462).

#### (4) Substrate Selectivity of OAT1 (Test of Inhibition by Addition of Drug)

The effect of addition of various families of drugs was investigated in a PAH uptake test in ova injected with rat OAT1 gene cRNA.

The PAH uptake test was conducted in accordance with the method described in Step (1) above using ova that had been injected with rat OAT1 gene cRNA. However, PAH uptake was measured using the sodium uptake solution in the presence or absence (control) of 2 mM of various compounds (unlabeled).

As shown in Figure 8, cis-inhibition was observed with the addition of structurally unrelated drugs. Cephaloridine ( $\beta$ -lactam antibiotic), nalidixic acid (old quinolone), furosemide and ethacrynic acid (diuretics), indomethacin (NSAID), probenecid (uricosuric), and valproic acid (antiepileptic) strongly inhibited (85%>) the OAT-1 mediated uptake of PAH. The antitumor drug methotrexate moderately inhibited PAH uptake. Endogenous substances such as prostaglandin  $E_2$ , c-AMP, c-GMP, and uric acid also inhibited PAH uptake.

#### (5) Substrate Selectivity of OAT1 (Uptake Test Using Various Anionic Substances as Substrates)

Uptake by OAT1 was investigated using various anionic substances as substrates.

The uptake tests were conducted in accordance with the method described in Step (1) above using ova that had been injected with rat OAT1 gene cRNA. However, in place of the  $^{14}$ C-PAH substrate, various radioactively labeled substances were used. Ova that had not been injected with RNA were used as controls.

As shown in Figure 9, when methotrexate ( $^3$ H labeled), c-AMP ( $^3$ H labeled), c-GMP ( $^3$ H labeled), prostaglandin  $E_2$  ( $^3$ H labeled), uric acid ( $^{14}$ C labeled), and  $\alpha$ -ketoglutaric acid ( $^{14}$ C labeled) were used as substrates, uptake in the ova was observed. On the other hand, no uptake was found with TEA ( $^{14}$ C labeled) and taurocholic acid.

#### *Example 3 Cloning of Human Organic Anion Transporter*

Fragments of rat OAT1 gene cDNA obtained in Example 1 (2) were labeled and used as probes in screening of a human cDNA library. A human cDNA library prepared using human kidney poly(A)<sup>+</sup> RNA (produced by Clone-Tech?) was used as the gene source for the human cDNA library.

For the positive clones that were obtained, i.e., clones containing the human organic anion transporter (human OAT1) cDNA, the base sequence was determined in the same





manner as in Example 1, the base sequence of the cDNA was analyzed by conventional methods, and the amino acid sequence of human OAT1 coded for by the translating region of the cDNA was determined. The human OAT1 sequences are shown in Sequence No. 2 of the sequence table below.

Homology between rat OAT1 and human OAT1 by amino acid label was approx. 85%. Homology by cDNA label was approx. 79%.

#### *Industrial Applicability*

The inventive organic anion transporter OAT1 and its gene appears to be useful in clarifying drug kinetics and toxin kinetics on a molecular level through *in vitro* analysis of drug elimination and drug-drug interaction and the like. Most of the drugs that cause renal failure such as  $\beta$ -lactam antibiotics, diuretics and NSAIDs are transported by OAT1, and it appears that it will be possible to develop a method using OAT1 to screen drugs to prevent nephrotoxicity because our findings suggest that drugs cause nephrotoxicity due to accumulation brought about by OAT1.





<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C12N 15/12, 15/63, C07K 14/47, 16/18,</b> <b>C12Q 1/68, C12P 21/08</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO98/53064</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1998年11月26日(26.11.98)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP98/02171  <b>(22) 国際出願日</b> 1998年5月18日(18.05.98)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平9/134182 1997年5月23日(23.05.97) JP  <b>(71) 出願人; および</b> <b>(72) 発明者</b> 遠藤 仁(ENDOU, Hitoshi)[JP/JP] 〒229-0022 神奈川県相模原市由野台1丁目23-7 Kanagawa, (JP) <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 田辺製薬株式会社(TANABE SEIYAKU CO., LTD.)(JP/JP) 〒541-8505 大阪府大阪市中央区道修町3丁目2番10号 Osaka, (JP) <b>(72) 発明者; および</b> <b>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</b> 金井好克(KANAI, Yoshikatsu)[JP/JP] 〒193-0932 東京都八王子市緑町214-102 Tokyo, (JP) 関根孝司(SEKINE, Takashi)[JP/JP] 〒190-0003 東京都立川市栄町1丁目10-47 Tokyo, (JP) 細山田真(HOSOYAMADA, Makoto)[JP/JP] 〒181-0013 東京都三鷹市下連雀3丁目42-4-301 Tokyo, (JP)	<b>(74) 代理人</b> 弁理士 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)  <b>(81) 指定国</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーロパ特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  添付公開書類 国際調査報告書  10/086,816	
<b>(54)Title: ORGANIC ANION TRANSPORTER AND GENE CODING FOR THE SAME</b>  <b>(54)発明の名称</b> 有機陰イオントランスポーターおよびその遺伝子  <b>(57) Abstract</b> A protein capable of transporting organic anions having amino acid sequences represented by SEC ID NO:1 or 2 or amino acid sequences derived therefrom by deletion, substitution or addition of one or more amino acid residues; and a gene coding for the protein. The protein and gene therefor are useful for <i>in vitro</i> analysis of drug release and drug-drug interactions and development of methods for screening drugs useful for preventing nephrotoxicity.		

配列番号 1 または 2 で示されるアミノ酸配列、または該配列番号 1 または 2 で示されるアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる有機陰イオンを輸送する能力を有する蛋白質、該蛋白質をコードする遺伝子。これらは薬物排出や薬物と薬物との相互作用のインビトロ分析、または腎毒性防止に有用な薬物のスクリーニング方法の開発に有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AM	アルメニア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AT	オーストリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SN	セネガル
AU	オーストラリア	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサオ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	US	米国
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CH	スイス	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CM	カメルーン	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CZ	チェッコ	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア		

## 明 細 書

## 有機陰イオントランスポーターおよびその遺伝子

## 5 技術分野

本発明は腎臓における有機陰イオンの輸送に関与する遺伝子と、その遺伝子がコードするポリペプチドに関する。

## 背景技術

10 腎臓は、生体異物や薬物の体外への排出に関して、重要な役割を果たしている。アニオン性の薬物は、担体を介した経路で腎臓近位尿細管から尿中へ排出されている。このような有機陰イオンの排出は、尿細管細胞がその側底膜を介して、有機陰イオンを尿細管周囲の血液から取り込むことから始まる。

15 側底膜における有機陰イオンの取り込みについては、例えば基質の有機陰イオンとしてパラアミノ馬尿酸を使い、摘出臓器かん流法や単離細胞膜小胞系などを用いた実験により研究されてきた。この研究の中で、有機陰イオンの取り込みには、有機陰イオントランスポーターが関与していること、また、側底膜における有機陰イオンの取り込みは、有機アニオンとジカルボン酸の交換輸送体によって介されと考えられてきた。

20 しかし、従来の手法では、尿細管における輸送機構の詳細、例えばトランスポーター間での輸送のネットワークや腎排泄過程における薬物間の相互作用などを解析することは困難であり、有機陰イオントランスポーターの遺伝子を単離して詳細な機能解析を可能とすることが望まれていた。

25 肝臓で発現している有機陰イオントランスポーター遺伝子については、

種々の分子種がクローニングされている(Hagenbuchら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第88巻、10629頁、1991年; Jacqueminら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第91巻、133頁、1994年)。また、腎臓および肝臓に発現する有機陽イオントランスポーターの一つであるOCT1の遺伝子クローニングが報告されてい(Grundemannら、Nature、第372巻、549頁、1994年)。

また、ジカルボン酸のトランスポーターとして、腎臓のナトリウム依存性ジカルボン酸トランスポーター(NaDC-1)の遺伝子クローニングが報告されている(Pajorら、J. Biol. Chem.、第270巻、5779頁、1995年)。

また、最近、ナトリウム非依存性ラット肝有機陰イオントランスポーター(oatp)の類縁遺伝子として、ラットの腎尿細管に局在する有機陰イオントランスポーターOAT-K1の遺伝子のクローニングが報告された(Saitoら、J. Biol. Chem.、第270巻、20719頁、1996年)。しかしながら、このOAT-K1については、その輸送機構が、有機アニオンとジカルボン酸の交換輸送によるものであるとは確認されていない。

#### 発明の開示

本発明の目的は、腎臓における有機陰イオン輸送に関与する新規な有機陰イオントランスポーター遺伝子およびその遺伝子がコードするポリペプチドである有機陰イオントランスポーターを提供することにある。その他の目的については、以下の記載より明らかである。

本発明者らは、ラット腎臓細胞から、有機陰イオンを輸送する能力を有する新規タンパク質の遺伝子をクローニングし、さらにヒトの相同遺伝子(ホモログ)をクローニングした。さらに、これら遺伝子の産物をアフリカツメガエルの卵母細胞中で発現させて有機陰イオンの輸送能を確

認することに成功し、本発明を完成するにいたった。

すなわち、本発明は、以下の(A)、(B)、(C)および(D)から選択されるタンパク質である。

(A)配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

5 (B)配列番号1で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ有機陰イオンを輸送する能力を有するタンパク質。

(C)配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

10 (D)配列番号2で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ有機陰イオンを輸送する能力を有するタンパク質。

また、本発明は、以下の(a)、(b)、(c)および(d)から選択されるDNAからなる遺伝子である。

(a)配列番号1で示される塩基配列からなるDNA。

15 (b)配列番号1で示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ有機陰イオンを輸送する能力を有するタンパク質をコードするDNA。

(c)配列番号2で示される塩基配列からなるDNA。

20 (d)配列番号2で示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ有機陰イオンを輸送する能力を有するタンパク質をコードするDNA。

本発明の有機陰イオンを輸送する能力を有する新規タンパク質、すなわち有機陰イオントランスポーター(OAT1: Organic Anion Transporter 1)は、生体内においては腎臓の尿細管で主に発現している。

25 また、有機陰イオントランスポーターOAT1は、その有機陰イオン

輸送能(発現細胞への有機陰イオン取り込み)が細胞内ジカルボン酸の存在によって活性化される。このことから、有機アニオンとジカルボン酸の交換輸送を行うトランスポーターであると考えられる。また、交換輸送に際しては、OAT1によって有機陰イオンと交換に細胞外にだされるジカルボン酸は、ナトリウム依存性ジカルボン酸トランスポーター(NaDC-1)によって細胞に取り込まれ、リサイクルされ则认为られる。

また、本発明の有機陰イオントランスポーターOAT1は、環状塩基、プロスタグランジン、尿酸のほか、抗生物質、非ステロイド系抗炎症薬、利尿薬、抗腫瘍薬等種々の異なる構造を持った薬物に対してこれらを輸送する(取り込む)能力を有する、非常に広い範囲の基質選択性を有するものである。

また、本発明の有機陰イオントランスポーターOAT1は、既に報告されているラット腎の有機陰イオントランスポーターOAT-K1とは、相同性がなく、全く別の分子種であると考えられる。

#### 図面の簡単な説明

図1はラットのナトリウム依存性ジカルボン酸塩トランスポーター(rNaDC-1)遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞によるグルタル酸の取り込み実験の結果を示す図である。

図2はラット腎組織由来mRNAおよび/またはラットNaDC-1遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞によるパラアミノ馬尿酸(以下、“PAH”と略す)の取り込み実験の結果を示す図である。

図3はラット有機陰イオントランスポーターOAT1の疎水性プロットを示す図である。

図4はラットの各臓器組織におけるOAT1遺伝子mRNAの発現をノーザンブロッティングにより解析した結果を示した電気泳動の写真で



ある。

図5はラットOAT1遺伝子cRNAを注入した卵母細胞によるPAHの取り込み実験においてグルタル酸とのプレインキュベーションの影響およびrNaDC-1との共発現の効果を調べた結果を示す図である。

5 図6はラットOAT1遺伝子cRNAを注入した卵母細胞によるPAHの取り込み実験において添加するナトリウム塩の影響を調べた結果を示す図である。

図7はラットOAT1遺伝子cRNAを注入した卵母細胞によるPAHの取り込み実験において基質PAHの濃度の影響を調べた結果を示す図である。

10 図8はラットOAT1遺伝子cRNAを注入した卵母細胞によるPAHの取り込み実験において、系への各種薬物添加の影響を調べた結果を示す図である。

図9は基質として各種薬物を用いた場合の、ラットOAT1遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による放射能標識化合物の取り込み実験の結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

20 後記配列表の配列番号1は、ラットの腎臓由来の有機陰イオントランスポーター(ラットOAT1)の遺伝子の全長cDNA塩基配列(約2.2 kbp)、およびその翻訳領域にコードされたタンパク質のアミノ酸配列(551アミノ酸)を表す。

25 配列番号2は、ヒトの腎臓由来の有機陰イオントランスポーター(ヒトOAT1)の遺伝子の全長cDNA塩基配列(約2.2 kbp)、およびその翻訳領域にコードされたタンパク質のアミノ酸配列(563アミノ酸)を表す。

前記配列番号 1 および 2 に示される塩基配列もしくはアミノ酸配列について、既知 DNA データベース (GenBank および EMBL) およびプロテインデータベース (NBRF および SWISS-PROT) に含まれる全ての配列に対してホモロジー検索を行った結果、一致するものはなく、これら配列は、新規なものであると考えられる。

本発明のタンパク質としては、配列番号 1 または 2 で示されたアミノ酸配列を有するもののほか、例えば配列番号 1 または 2 で示されたアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するものが挙げられる。アミノ酸の欠失、置換もしくは付加は、有機陰イオン輸送活性が失われない程度であればよく、通常 1 ～ 約 110 個、好ましくは 1 ～ 約 55 個である。このようなタンパク質は、配列番号 1 または 2 で示されたアミノ酸配列と通常、80% 以上、好ましくは 90% 以上のアミノ酸配列のホモロジーを有する。

また、本発明の遺伝子としては、配列番号 1 または 2 で示された塩基配列を有する DNA を含むもののほか、配列番号 1 または 2 で示された塩基配列を有する DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし得る DNA を含むものが挙げられる。このようにハイブリダイズし得る DNA は、その DNA にコードされるタンパク質が有機陰イオンを輸送する能力を有するものであればよい。このような DNA は、配列番号 1 または 2 で示された塩基配列と、通常、70% 以上、好ましくは 80% 以上の塩基配列のホモロジーを有する。このような DNA としては、自然界で発見される変異型遺伝子、人為的に改変した変異型遺伝子、異種生物由来の相同遺伝子等が含まれる。

本発明において、ストリンジントな条件下でのハイブリダイゼーションは、通常のストリンジントな条件 (ローストリンジントな条件)

では、ハイブリダイゼーションを、 $5 \times \text{SSC}$ またはこれと同等の塩濃度のハイブリダイゼーション溶液中、 $37-42^{\circ}\text{C}$ の温度条件下、約12時間行い、 $5 \times \text{SSC}$ またはこれと同等の塩濃度の溶液等で必要に応じて予備洗浄を行った後、 $1 \times \text{SSC}$ またはこれと同等の塩濃度の溶液中で洗浄を行うことにより実施できる。また、より高いストリンジェンシーを有する条件(ハイストリンジェントな条件)では、前記において、洗浄を $0.1 \times \text{SSC}$ またはこれと同等の塩濃度の溶液中で行うことにより実施できる。

本発明の有機陰イオントランスポーター遺伝子は、適当な哺乳動物の腎臓の組織や細胞を遺伝子源として用いてスクリーニングを行うことにより単離取得できる。哺乳動物としては、イヌ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、サル、ブタ、ウサギ、ラットおよびマウスなどの非ヒト動物のほか、ヒトが挙げられる。

遺伝子のスクリーニングおよび単離は、発現クローニング(Expression Cloning)などにより好適に実施できる。

例えば、ラット腎臓組織を遺伝子源として用い、これからmRNA(ポリ(A)<sup>+</sup>RNA)を調製する。これを、分画し、各画分について、ラットナトリウム依存性ジカルボン酸塩トランスポーター(rNaDC-1)のcRNAとともに、アフリカツメガエルの卵母細胞に導入する。

NaDC-1遺伝子のcDNAはすでに報告されている(Pajorら、J. Biol. Chem.、第270巻、5779頁、1995年)ので、この配列情報から、PCR法などを用いて、容易にNaDC-1遺伝子のcDNAを得ることが可能である。得られたNaDC-1 cDNAから、T3またはT7 RNAポリメラーゼ等を用いて、これに相補的なRNA(cRNA)(キャップ化されたもの)を合成できる。

mRNAと、NaDC-1cRNAを導入した卵母細胞について、例えば PAHなどを基質(有機陰イオン)として、細胞内への基質の輸送(取込み)を測定し、高い取り込みを示したmRNAの画分を選択することにより、OAT1のmRNAを濃縮できる。この濃縮されたmRNAをもとに、  
5 cDNAライブラリーを作製する。ライブラリーのcDNAから、cRNA(キャップ化されたもの)を調製し、各々のクローンについて、前記と同様にして、NaDC-1cRNAとともに卵母細胞に導入し、基質の取り込み活性を指標として、陽性クローンを選択することにより、OAT1遺伝子のcDNAを含むクローンを得ることができる。

10 得られたcDNAについては、常法により塩基配列を決定し、翻訳領域を解析して、これにコードされるタンパク質、すなわち、OAT1のアミノ酸配列を決定することができる。

得られたcDNAが、有機陰イオントランスポーター遺伝子のcDNAであること、すなわちはcDNAにコードされた遺伝子産物が有機陰イオントランスポーターであることは、例えば次のようにして検証することができる。すなわち、得られたOAT1遺伝子のcDNAから調製したcRNAを卵母細胞内に導入して発現させ、有機陰イオンを細胞内へ輸送する(取り込む)能力を、前記と同様、適当な有機陰イオンを基質とする通常の取込み試験(Kanai and Hediger、Nature、第360巻、467-471頁、  
15 1992年)により、細胞内への基質の取り込みを測定することにより確認できる。

また、発現細胞について、同様の取り込み実験を応用して、OAT1の特性、例えば、OAT1がジカルボン酸との交換輸送を行っているという特性や、OAT1の基質特異性などを調べることができる。

25 得られたOAT1遺伝子のcDNAを用いて、異なる遺伝子源で作製さ

れた適当なcDNAライブラリーまたはゲノミックDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、異なる組織、異なる生物由来の相同遺伝子や染色体遺伝子等を単離することができる。

5 また、開示された本発明の遺伝子の塩基配列(配列番号1および2に示された塩基配列、もしくはその一部)の情報に基づいて設計された合成プライマーを用い、通常のPCR(Polymerase Chain Reaction)法によりcDNAライブラリーまたはゲノミックDNAライブラリーから遺伝子を単離することができる。

10 cDNAライブラリーおよびゲノミックDNAライブラリー等のDNAライブラリーは、例えば、「モレキュラークローニング(Molecular Cloning)」(Sambrook, J., Fritsch, E. F.およびManiatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊)に記載の方法により調製することができる。あるいは、市販のライブラリーがある場合はこれを

15 本発明の有機陰イオントランスポーター(OAT1)は、例えば、有機陰イオントランスポーターをコードするcDNAを用い、遺伝子組換え技術により生産することができる。例えば、有機陰イオントランスポーターをコードするDNA(cDNA等)を適当な発現ベクターに組み込み、得られた組換えDNAを適当な宿主細胞に導入することができる。ポリペプチドを生産するための発現系(宿主-ベクター系)としては、例えば、  
20 細菌、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞の発現系等が挙げられる。このうち、機能タンパクを得るためには、昆虫細胞および哺乳動物細胞を用いることが好ましい。

例えば、ポリペプチドを哺乳動物細胞で発現させる場合には、有機陰  
25 イオントランスポーターをコードするDNAを、適当な発現ベクター(例

例えば、レトロウイルス系ベクター、パピローマウイルスベクター、ワク  
シニアウイルスベクター、SV40系ベクター等)中の適当なプロモータ  
ー(例えば、SV40プロモーター、LTRプロモーター、エロンゲーシ  
ョン1 $\alpha$ プロモーター等)の下流に挿入して発現ベクターを構築する。次  
5 に、得られた発現ベクターで適当な動物細胞を形質転換し、形質転換体  
を適当な培地で培養することによって、目的とするポリペプチドが生産  
される。宿主とする哺乳動物細胞としては、サルCOS-7細胞、チャ  
イニーズハムスターCHO細胞、ヒトHeLa細胞または、腎臓組織由来  
の初代培養細胞やブタ腎由来LLC-PK1細胞、フクロネズミ腎由来  
10 OK細胞等の細胞株等が挙げられる。

有機陰イオントランスポーターOAT1をコードするDNAとしては、  
例えば、配列番号1および2に示される塩基配列を有するcDNAを用い  
ることができるほか、前記のcDNA配列に限定されることなく、アミノ  
酸配列に対応するDNAを設計し、ポリペプチドをコードするDNAと  
15 して用いることもできる。この場合、ひとつのアミノ酸をコードするコ  
ドンは各々1～6種類知られており、用いるコドンの選択は任意でよい  
が、例えば発現に利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現  
効率の高い配列を設計することができる。設計した塩基配列を持つDN  
Aは、DNAの化学合成、前記cDNAの断片化と結合、塩基配列の一部  
20 改変等によって取得できる。人為的な塩基配列の一部改変、変異導入は、  
所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを  
利用して部位特異的変異導入法(site specific mutagenesis)(Mark, D.  
F. et al., Proceedings of National Academy of Sciences, 第81巻、  
第5662～5666頁(1984年))等によって実施できる。

25 本発明の有機陰イオントランスポーター遺伝子にストリンジेंटな

条件下でハイブリダイズするヌクレオチド(オリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド)は、有機陰イオントランスポーター遺伝子を検出するためのプローブとして使用できるほか、有機陰イオントランスポーター遺伝子の発現を変調させるために、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドや、リボザイム、デコイとして使用することもできる。このようなヌクレオチドとしては、例えば、配列番号1または2で示される塩基配列の中の通常、連続する14塩基以上の部分配列もしくはその相補的な配列を含むヌクレオチドを用いることができ、ハイブリダイズをより特異的とするためには部分配列としてより長い配列、例えば20塩基以上あるいは30塩基以上の配列を用いてもよい。

また、本発明の有機陰イオントランスポーターまたはこれと免疫学的同等性を有するポリペプチドを用いて、その抗体を取得することができ、抗体は、有機陰イオントランスポーターの検出や精製などに利用できる。抗体は、本発明の有機陰イオントランスポーター、その断片、またはその部分配列を有する合成ペプチド等を抗原として用いて製造できる。ポリクローナル抗体は、宿主動物(例えば、ラットやウサギ等)に抗原を接種し、免疫血清を回収する、通常の方法により製造することができる。また、モノクローナル抗体は、通常のハイブリドーマ法などの技術により製造できる。

以下、実施例をもって本発明をさらに詳しく説明するが、これらの実施例は本発明を制限するものではない。

なお、下記実施例において、各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング(Molecular Cloning)」(Sambrook, J., Fritsch, E.F.およびManiatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊)に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキッ

トを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

#### 実施例

#### 実施例1 ラット有機陰イオントランスポーターのクローニング

##### (1) ラットジカルボン酸塩トランスポーターcDNAの単離とcRNAの調製

cDNAライブラリーは、ラットポリ(A)<sup>+</sup>RNAから、cDNA合成用キット(商品名: SuperScript Choice System、ギブコ社製)を使用して作成し、ファージベクターλ Ziplox(ギブコ社製)の制限酵素EcoRI切断部位に組み込んだ。PCR法にて、ウサギのナトリウム依存性ジカルボン酸トランスポーターNaDC-1遺伝子(Pajorら、J. Biol. Chem.、第270巻、5779頁、1995年)の第1323-1763番目の塩基に相当するセグメントを<sup>32</sup>P-dCTPでラベルし、これをプローブとして用いて、ラットのcDNAライブラリーをスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、37℃のハイブリダイゼーション用溶液中で一晩行い、フィルター膜は、37℃で0.1×SSC/0.1%SDSで洗浄した。ハイブリダイゼーション用溶液としては、5×SSC、3×デンハード液(Denhard's液)、0.2% SDS、10%硫酸デキストラン、50%ホルムアミド、0.01% Antiform B(商品名、シグマ社製)(消泡剤)、0.2mg/ml サーモン精子変性DNA、2.5mM ピロリン酸ナトリウム、25mM MESを含むpH 6.5の緩衝液を用いた。λ Ziploxファージに組込まれたcDNA部分を、塩基配列決定のために、プラスミドpZL1に組み込み、さらにプラスミドpBluescript IISK-(Stratagene社製)へサブクローン化した。

上記により得られたラットジカルボン酸塩トランスポーターのcDNAを含むプラスミドから、T7RNAポリメラーゼを用いて、cRNA(cD



NAに相補的なRNA)を調製した。

得られたcRNAを、金井らの方法(Kanai and Hediger、Nature、第360巻、第467-471頁、1992年)に準じて、アフリカツメガエルの卵母細胞に注入し、この卵母細胞について、基質としてグルタル酸を用いる取り込み実験を行った。実験には、放射能ラベルした基質( $^{14}\text{C}$ -グルタル酸)を用い、また取り込み溶液として、ナトリウムイオンの影響を調べるためのナトリウムの取り込み溶液(96mM 塩化ナトリウム、2mM 塩化カリウム、1.8mM 塩化カルシウム、1mM 塩化マグネシウム、5mM HEPES、pH 7.4)、塩化コリンイオンの影響を調べるための塩化コリン取り込み溶液(96mM 塩化コリン、2mM 塩化カリウム、1.8mM 塩化カルシウム、1mM 塩化マグネシウム、5mM HEPES、pH 7.4)を用い、これらに $^{14}\text{C}$ -グルタル酸を1mM濃度で添加して試験液とした。コントロールにはRNAを注入しない卵母細胞を用いた。

その結果を図1に示す。図1から明らかなように、塩化コリン取り込み溶液ではrNaDC-1のcRNAを注入した卵母細胞とコントロールのいずれにおいてもグルタル酸の取り込みが認められなかった。これに対し、ナトリウム取り込み溶液ではrNaDC-1のcRNAを注入した卵母細胞において著しいグルタル酸の取り込みが認められた。すなわちグルタミン酸の取り込みがナトリウム依存性であることが示され、クローニングしたcDNAがラットジカルボン酸塩トランスポーター遺伝子のものであることが確認できた。

(2)ラット腎臓有機陰イオントランスポーターOAT1のクローニング

金井らの方法(Kanai and Hediger、Nature、第360巻、第467-471頁、1992年)に準じて、発現クローニング法により以下のようにして行った。

ゲル電気泳動によりラット腎臓ポリ(A) $^{+}$ RNA 400 $\mu\text{g}$ を分画した。

分画により得られた各画分を、上記(1)で得られたラットジカルボン  
酸塩トランスポーターのcRNAと共に卵母細胞に注入した。卵母細胞は、  
基質として1mM グルタル酸を含むナトリウム取り込み溶液(96mM 塩  
化ナトリウム、2mM 塩化カリウム、1.8mM 塩化カルシウム、1mM  
5 塩化マグネシウム、5mM HEPES、pH7.4)中にて予め2時間前培  
養したものをを用いた。

RNA注入した卵母細胞について、基質としてPAHを用い、基質の  
取り込み実験を金井らの方法(Kanai and Hediger、Nature、第360巻、第  
467-471頁、1992年)に準じて、以下のようにして行った。基質として<sup>14</sup>  
10 C-PAH(50μM)を含みグルタル酸を含まないナトリウム取り込み  
溶液中にて1時間卵母細胞を培養して、細胞内に取り込まれた放射能の  
カウントで基質の取り込み率を測定した。その結果、図2に示すように、  
この系において、ラット腎臓のポリ(A)<sup>+</sup>RNA(mRNA)だけを注入し  
た卵母細胞、および、ラットジカルボン酸塩トランスポーターのcRNA  
15 のみを注入した卵母細胞では、PAHの取り込みは見られなかったのに  
対して、ラット腎臓のポリ(A)<sup>+</sup>RNAとラットジカルボン酸塩トランス  
ポーターのcRNAの両者を注入した卵母細胞ではPAHの取り込みが認  
められることを確認した。コントロールにはRNAを注入しない卵母細  
胞を用いた。

20 分画により得られた各RNA画分のうちRNAを注入した卵母細胞が、  
最も高いPAHの取り込み率を示した画分を選択した。この画分のポリ  
(A)<sup>+</sup>RNA(1.8~2.4kb)について、cDNA合成およびプラスミ  
ドクローニング用キット(商品名: Superscript Plasmid System、ギブコ  
社製)を使用して、cDNAのライブラリーを作成した。これらDNAは  
25 プラスミドpSPORT1(ギブコ社製)の制限酵素SalIおよびNotI認

識部位に組み込み、得られた組換えプラスミドDNAを大腸菌DH10B株のコンピテントセル(商品名:Electro Max DH10B Competent cell、ギブコBRL社製)に導入した。得られた形質転換体をニトロセルロース膜上で培養し、1プレート当たり約500個のコロニーが得られた。これらコロニーから、プラスミドDNAを調製し、これらを制限酵素Not Iで切断した。得られたDNAを用いて、in vitro転写により、キャップ化されたcRNAを合成した。

得られたcRNA(約10ng)を、上記(1)で得たラットジカルボン酸塩トランスポーターのcRNA(2ng)と共に卵母細胞へ注入した。これら卵母細胞について、前記と同様にして、PAHの取り込み実験を行うことにより陽性クローンのスクリーニングを行った。スクリーニングに際しては、複数のクローンから抽出したDNAをプールしたグループについて調べ、あるグループでPAHの取り込みが確認された場合、さらにそれを複数のグループに分割し、さらにスクリーニングを行った。

スクリーニングの結果、8000個のクローンから1つの陽性クローン(cRNAを注入した卵母細胞で基質の取り込みが認められるクローン)が単離された。

得られたクローン、すなわち、ラットジカルボン酸塩トランスポーターOAT1のcDNAを含むクローンについて、塩基配列決定のための欠失クローン作製用キット(商品名:Kilo-Sequense Deletion Kit、宝酒造社製)、合成プライマー、塩基配列決定用キット(商品名:Sequenase ver.2.0、アマシャム社製)を用いてダイデオキシ法により、cDNAの塩基配列を決定した。

これにより、ラットジカルボン酸塩トランスポーターOAT1遺伝子のcDNAの塩基配列が得られた。また、cDNAの塩基配列を常法によ

り解析して、cDNA上の翻訳領域とそこにコードされるOAT1のアミノ酸配列を決定した。これら配列を、後記配列表の配列番号1に示した。

疎水性プロット(Kyte-Doolittle hydropathy analysis)により、OAT1のアミノ酸配列を解析した結果、図3に示したように、12個の膜貫通領域(membrane-spanning domains)が予測された。また、5つの糖鎖付加部位が最初の親水性ループに予測された。6番目と7番目の膜貫通領域(transmembrane domains)の親水基のループにプロテインキナーゼC依存性のリン酸化部位と考えられる部位が4つあった。

(3)種々の組織におけるOAT1遺伝子の発現(ノーザンブロッティングによる解析)

ラットOAT1遺伝子の全長cDNAを $^{32}\text{P}$ -dCTPでラベルし、これをプローブとして用いて、ラットの種々の組織から抽出したRNAに対してノーザンブロッティングを以下のように行なった。3 $\mu\text{g}$ のポリ(A) $^{+}$ RNAを1%アガロース/ホルムアルデヒドゲルで電気泳動したのち、ニトロセルロースフィルターにトランスファーした。このフィルターを42°Cで、 $^{32}\text{P}$ -dCTPでラベルした全長のOAT1cDNAを含んだハイブリダイゼーション液で1晩ハイブリダイゼーションを行った。フィルターを、65°Cにて、0.1%SDSを含む0.1xSSCで洗浄した。

ノーザンブロッティングの結果、図4に示すように、腎臓において、2.4kb付近と3.9kbと4.2kbに相当する2つのバンドが検出され、発現が認められた。腎臓の皮質と髄質外層ではOAT1 mRNAの発現量が多く、髄質内層では少なかった。

さらに長時間の感光で、脳において2.4kb付近にかすかなバンドが検出されたが、その他の組織ではバンドは検出されず、発現は認められな

かった。

(4)腎組織におけるOAT1遺伝子の発現(In situ ハイブリダイゼーションによる解析)

5 In situ ハイブリダイゼーションを以下のように行った。すなわち、  
ラットの腎臓を4% パラホルムアルデヒドで灌流することにより固定した  
後、これを細切り、4% パラホルムアルデヒドでさらに固定した。得  
られたラット腎臓を5  $\mu$ mの厚さに薄切し、得られた切片を、in situ  
ハイブリダイゼーションに用いた。

10 全長のOAT1 cDNAから、T7もしくはT3 RNAポリメラーゼを  
用いて、<sup>35</sup>SでラベルしたセンスcRNAとアンチセンスcRNAを合成  
し、プローブとして用いた。切片をハイブリダイゼーション液で一晩ブ  
ローブでハイブリダイゼーションを行ない、0.1  $\times$  SSCで30分、3  
7  $^{\circ}$ Cにて洗浄した。

15 In situ ハイブリダイゼーションの結果、ラット腎臓では、OAT1  
mRNAは腎臓の皮質と髄質外層、特に皮質の髄放線の部分で発現するこ  
とが示された。髄質内層では発現は検出されなかった。この結果は、有  
機陰イオントランスポーターOAT1が近位尿細管の中間部分で最も多  
く発現されることを示している。

実施例2 有機陰イオントランスポーターOAT1の特徴づけ

20 (1)OAT1の輸送活性におけるグルタル酸の影響

ラットOAT1遺伝子cRNAを注入した卵母細胞によるPAHの取り  
込み実験においてグルタル酸とのプレインキュベーションの影響を調べ  
た。

25 PAHの取り込み実験は、前記実施例1(2)記載方法に準じ、以下の  
ように行った。すなわち、ラットOAT1遺伝子cRNAもしくは、ラッ

トOAT1遺伝子cRNAとラットNaDC-1cRNAを注入した卵母細胞を、1mM グルタル酸添加もしくは無添加のナトリウム取り込み溶液中で2時間前培養したあと、 $^{14}\text{C}$ -PAHを添加して室温で1時間培養し放射能でラベルされた基質の取り込みを測定した。

5       その結果、図5に示すように、PAHの取り込みは、1mMグルタル酸で卵母細胞を前処置することによって増加した。また、ラットジカルボン酸塩トランスポーターとOAT1が発現している卵母細胞をグルタル酸で前処置すると、さらに $^{14}\text{C}$ -PAHの取り込みの増加が見られた。この結果に示されるグルタル酸の効果は、PAH取り込みの細胞内ジカルボン酸濃度依存性を示しており、OAT1が有機アニオンとジカルボン酸の交換輸送体であると考えられた。コントロールにはRNAを注入しない卵母細胞を用いた。

#### (2)OAT1の輸送活性の塩依存性

15       ラットOAT1遺伝子cRNAを注入した卵母細胞によるPAHの取り込み実験において培養液に添加する塩の影響を調べた。

20       PAHの取り込み実験は、ラットOAT1遺伝子cRNAを注入した卵母細胞を用い、前記(1)記載方法に準じて実施した。但し、取り込み溶液は、塩として塩化コリンイオンを添加した場合の影響をみる場合には、ナトリウム取り込み溶液にかえて、前記実施例1の(1)で用いたものと同じ塩化コリン取り込み溶液を用いた。

      その結果、図6に示すように、細胞外のナトリウムをコリンと置換しても、PAH取り込みに何ら影響を与えなかった。このことから、OAT1はナトリウムイオン非依存性に働くトランスポーターであることが示された。コントロールにはRNAを注入しない卵母細胞を用いた。

#### 25       (3)OAT1のミカエリスメンテンの動力学試験

基質PAHの濃度の違いによるPAHの取り込み率の変化を調べることにより、有機陰イオントランスポーターのミカエリス-メンテンの動力学試験を行った。

5 PAHの取り込み実験は、ラットOAT1遺伝子cRNAを注入した卵母細胞を用い、前記(1)記載の方法に準じて実施した。但し、 $^{14}\text{C}$ -PAH取り込みは3分間測定した。その結果、図7に示すように、 $K_m$ 値は約  
14.3  $\pm$  2.9  $\mu\text{M}$ であった。この $K_m$ 値は、既にin vivo 系で報告されている基底側の有機アニオントランスポート系の $K_m$ 値(80  $\mu\text{M}$ )(Ulrich  
ら、Am. J. Physiol. 第254巻、F453-462頁、1988年)とほぼ同様であった。  
10

#### (4) OAT1の基質選択性(薬物添加による阻害試験)

ラットOAT1遺伝子cRNAを注入した卵母細胞によるPAHの取り込み実験において、系への各種薬物添加の影響を調べた。

15 PAHの取り込み実験は、ラットOAT1遺伝子cRNAを注入した卵母細胞を用い、前記(1)記載方法に準じて実施した。但し、ナトリウム取り込み溶液を用い、2 mMの各種化合物(非標識)の存在下および非存在下(コントロール)で、PAHの取り込みを測定した。

その結果、図8に示すように、構造的に無関係の薬物の添加で、cis-阻害効果が観察された。セファロリジン( $\beta$ -ラクタム系抗生物質)、ナリジクス酸(オールドキノロン)、フロセミドとエタクリン酸(利尿薬)、  
20 インドメタシン(非ステロイド系抗炎症剤)、プロベネシド(尿酸排泄薬)、バルプロ酸(抗てんかん薬)はOAT-1を介したPAHの取り込みを強く阻害した(85% $>$ )。抗腫瘍薬であるメトトレキセートはPAHの取り込みを中等度に阻害した。プロスタグランジンE<sub>2</sub>、c-AMP、  
25 c-GMP、尿酸といった内因性化合物もPAHの取り込みを阻害した。

(5)OAT1の基質選択性(各種陰イオン性物質を基質とする取り込み試験)

各種陰イオン性物質を基質として、OAT1による取り込みを調べた。

取り込み実験は、ラットOAT1遺伝子cRNAを注入した卵母細胞を用い、前記(1)に記載の方法に準じて実施した。但し、基質としては、<sup>14</sup>C-PAHにかえて、放射能でラベルされた各種の化合物を用いた。コントロールには、RNAを注入しない卵母細胞を用いた。

その結果、図9に示すように、メトトレキセート(<sup>3</sup>H標識物)、c-AMP(<sup>3</sup>H標識物)、c-GMP(<sup>3</sup>H標識物)、プロスタグランジンE<sub>2</sub>(<sup>3</sup>H標識物)、尿酸(<sup>14</sup>C標識物)、α-ケトグルタル酸(<sup>14</sup>C標識物)を基質とした場合に、卵母細胞への取り込みが認められた。一方、TEA(<sup>14</sup>C標識物)とタウロコール酸では取り込みを示さなかった。

実施例3 ヒト有機陰イオントランスポーターのクローニング

実施例1の(2)にて得たラットOAT1遺伝子のcDNA断片を標識し、これをプローブとして用いて、ヒトcDNAライブラリーをスクリーニングした。ヒトcDNAライブラリーは、遺伝子源としてヒト腎ポリ(A)<sup>+</sup>RNA(クロンテク社製)を用いて作製したヒトcDNAライブラリーを用いた。

また、得られた陽性クローン、すなわち、ヒト有機陰イオントランスポーター(ヒトOAT1)cDNAを含むクローンについて、実施例1と同様にして、塩基配列を決定し、得られたcDNAの塩基配列を常法により解析して、cDNA上の翻訳領域とそこにコードされるヒトOAT1のアミノ酸配列を決定した。これらヒトOAT1の配列を、後記配列表の配列番号2に示した。

ラットOAT1とヒトOAT1とのホモロジーは、アミノ酸レベルで



約 85% であった。また、cDNA レベルでのホモロジーは、約 79% であった。

#### 産業上の利用の可能性

- 5 本発明の有機陰イオントランスポーター OAT 1 およびその遺伝子は、薬物排出や薬物と薬物の相互作用のインビトロでの分析など、薬物動態や毒物動態の分子レベルでの解明に有用と考えられる。また、 $\beta$ ラクタム系抗生物質、利尿薬、非ステロイド系抗炎症薬のような腎不全の原因となる多くの薬物が、OAT 1 によって輸送され、薬物が腎毒性を引き起こす原因は OAT 1 に起因する蓄積性による可能性が示唆されること
- 10 から、OAT 1 を用いて腎毒性を防止するための薬物をスクリーニングする方法を開発し得ると考えられる。

## 配 列 表

配列番号：1

配列の長さ：2294

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：ラット

配列

GCTCCAGCAG ACCCTGAAAG CTGAGCTGTC CAGACCCCCG AAGTGAAGAA AAGAGGCGAG	60
GGCAAGGGAG GGCCAGAACC GAGGGAGAGA GAAAGGAGGG GCAGCCCACC AGCCCGCTGT	120
CCTGCCACAG AACCGGCTCA GCTCCAGCTC CAGGAGTCAC TCAGCTGCAG AGGCAGTGGC	180
AGCCCCACTC CTCAGGCAAA GGGCAGCAGA CAGACAGACA GAGGTCCTAG GACTGGAGGT	240
CCTCAGTCAT TGACCACTCA GCCTGGCCCA GCCCC	275
ATG GCC TTC AAT GAC CTC CTG AAA CAG GTG GGG GGC GTC GGA CGC	320
Met Ala Phe Asn Asp Leu Leu Lys Gln Val Gly Gly Val Gly Arg	
1 5 10 15	
TTC CAG TTG ATC CAG GTC ACC ATG GTG GTT GCT CCC CTA CTG CTG	365
Phe Gln Leu Ile Gln Val Thr Met Val Val Ala Pro Leu Leu Leu	
20 25 30	
ATG GCT TCC CAC AAC ACC TTG CAG AAC TTC ACT GCC GCT ATC CCC	410
Met Ala Ser His Asn Thr Leu Gln Asn Phe Thr Ala Ala Ile Pro	
35 40 45	

CCT CAT CAC TGC CGC CCA CCT GCC AAT GCC AAT CTC AGC AAA GAT	455
Pro His His Cys Arg Pro Pro Ala Asn Ala Asn Leu Ser Lys Asp	
50 55 60	
GGA GGT CTG GAG GCC TGG CTG CCC CTG GAC AAG CAA GGA CAA CCC	500
Gly Gly Leu Glu Ala Trp Leu Pro Leu Asp Lys Gln Gly Gln Pro	
65 70 75	
GAA TCG TGC CTC CGC TTT ACT TCC CCC CAG TGG GGA CCA CCC TTT	545
Glu Ser Cys Leu Arg Phe Thr Ser Pro Gln Trp Gly Pro Pro Phe	
80 85 90	
TAC AAT GGC ACA GAA GCC AAT GGC ACC AGA GTC ACA GAG CCC TGC	590
Tyr Asn Gly Thr Glu Ala Asn Gly Thr Arg Val Thr Glu Pro Cys	
95 100 105	
ATT GAT GGC TGG GTC TAT GAC AAC AGC ACC TTC CCT TCA ACC ATC	635
Ile Asp Gly Trp Val Tyr Asp Asn Ser Thr Phe Pro Ser Thr Ile	
110 115 120	
GTG ACT GAG TGG AAC CTT GTG TGC TCT CAT CGG GCT TTC CGC CAG	680
Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Ser His Arg Ala Phe Arg Gln	
125 130 135	
CTG GCC CAG TCC CTG TAC ATG GTG GGA GTG CTG CTG GGA GCC ATG	725
Leu Ala Gln Ser Leu Tyr Met Val Gly Val Leu Leu Gly Ala Met	
140 145 150	
GTG TTT GGC TAC CTG GCG GAC AGG CTG GGC CGC CGG AAG GTG CTG	770
Val Phe Gly Tyr Leu Ala Asp Arg Leu Gly Arg Arg Lys Val Leu	
155 160 165	

ATC TTG AAC TAC CTG CAG ACA GCT GTG TCG GGA ACC TGT GCA GCC	815
Ile Leu Asn Tyr Leu Gln Thr Ala Val Ser Gly Thr Cys Ala Ala	
170 175 180	
TAT GCA CCC AAC TAT ACT GTC TAC TGC GTT TTC CGG CTC CTC TCG	860
Tyr Ala Pro Asn Tyr Thr Val Tyr Cys Val Phe Arg Leu Leu Ser	
185 190 195	
GGC ATG TCT TTG GCT AGC ATT GCA ATC AAC TGC ATG ACA CTA AAT	905
Gly Met Ser Leu Ala Ser Ile Ala Ile Asn Cys Met Thr Leu Asn	
200 205 210	
GTG GAA TGG ATG CCT ATC CAC ACC CGT GCC TAT GTG GGC ACC TTG	950
Val Glu Trp Met Pro Ile His Thr Arg Ala Tyr Val Gly Thr Leu	
215 220 225	
ATT GGC TAT GTC TAC AGC CTG GGC CAG TTC CTC CTG GCT GGC ATC	995
Ile Gly Tyr Val Tyr Ser Leu Gly Gln Phe Leu Leu Ala Gly Ile	
230 235 240	
GCC TAT GCT GTG CCC CAC TGG CGC CAC CTG CAG CTT GTG GTC TCT	1040
Ala Tyr Ala Val Pro His Trp Arg His Leu Gln Leu Val Val Ser	
245 250 255	
GTG CCT TTT TTC ATT GCC TTC ATC TAC TCT TGG TTC TTC ATT GAG	1085
Val Pro Phe Phe Ile Ala Phe Ile Tyr Ser Trp Phe Phe Ile Glu	
260 265 270	
TCA GCC CGC TGG TAC TCC TCC TCA GGA AGG CTG GAC CTC ACC CTC	1130
Ser Ala Arg Trp Tyr Ser Ser Ser Gly Arg Leu Asp Leu Thr Leu	
275 280 285	

CGA GCC CTG CAG AGA GTG GCC CGG ATC AAT GGG AAA CAA GAA GAA	1175
Arg Ala Leu Gln Arg Val Ala Arg Ile Asn Gly Lys Gln Glu Glu	
290 295 300	
GGG GCT AAG CTA AGT ATA GAG GTG CTC CGG ACC AGC CTG CAG AAG	1220
Gly Ala Lys Leu Ser Ile Glu Val Leu Arg Thr Ser Leu Gln Lys	
305 310 315	
GAA CTG ACT CTA AGC AAA GGC CAA GCC TCA GCC ATG GAG CTG CTG	1265
Glu Leu Thr Leu Ser Lys Gly Gln Ala Ser Ala Met Glu Leu Leu	
320 325 330	
CGC TGC CCC ACC CTT CGA CAC CTC TTC CTC TGT CTC TCC ATG CTG	1310
Arg Cys Pro Thr Leu Arg His Leu Phe Leu Cys Leu Ser Met Leu	
335 340 345	
TGG TTT GCC ACT AGC TTT GCC TAC TAC GGG CTG GTC ATG GAC CTG	1355
Trp Phe Ala Thr Ser Phe Ala Tyr Tyr Gly Leu Val Met Asp Leu	
350 355 360	
CAG GGC TTT GGG GTC AGC ATG TAC CTT ATC CAG GTG ATT TTC GGT	1400
Gln Gly Phe Gly Val Ser Met Tyr Leu Ile Gln Val Ile Phe Gly	
365 370 375	
GCC GTG GAC CTG CCT GCC AAG TTT GTA TGC TTC CTA GTC ATC AAC	1445
Ala Val Asp Leu Pro Ala Lys Phe Val Cys Phe Leu Val Ile Asn	
380 385 390	
TCC ATG GGG CGC CGG CCT GCA CAG ATG GCC TCC CTG CTG CTG GCA	1490
Ser Met Gly Arg Arg Pro Ala Gln Met Ala Ser Leu Leu Leu Ala	
395 400 405	

GGC ATC TGC ATC CTG GTG AAT GGC ATA ATA CCG AAG AGC CAT ACG	1535
Gly Ile Cys Ile Leu Val Asn Gly Ile Ile Pro Lys Ser His Thr	
410 415 420	
ATC ATT CGC ACC TCC CTG GCT GTG CTA GGG AAG GGC TGC CTG GCT	1580
Ile Ile Arg Thr Ser Leu Ala Val Leu Gly Lys Gly Cys Leu Ala	
425 430 435	
TCC TCT TTC AAC TGC ATC TTC CTG TAC ACC GGA GAG CTG TAC CCC	1625
Ser Ser Phe Asn Cys Ile Phe Leu Tyr Thr Gly Glu Leu Tyr Pro	
440 445 450	
ACA GTG ATT CGG CAG ACA GGC CTG GGC ATG GGC AGC ACC ATG GCC	1670
Thr Val Ile Arg Gln Thr Gly Leu Gly Met Gly Ser Thr Met Ala	
455 460 465	
CGG GTG GGC AGC ATT GTG AGC CCG CTG GTG AGC ATG ACT GCA GAG	1715
Arg Val Gly Ser Ile Val Ser Pro Leu Val Ser Met Thr Ala Glu	
470 475 480	
TTC TAC CCC TCC ATG CCT CTC TTC ATC TTC GGC GCT GTC CCT GTG	1760
Phe Tyr Pro Ser Met Pro Leu Phe Ile Phe Gly Ala Val Pro Val	
485 490 495	
GTC GCC AGT GCT GTC ACT GCC CTG CTG CCA GAG ACC TTG GGC CAG	1805
Val Ala Ser Ala Val Thr Ala Leu Leu Pro Glu Thr Leu Gly Gln	
500 505 510	
CCG CTG CCA GAT ACA GTG CAG GAC CTG AAG AGC AGG AGC AGA GGA	1850
Pro Leu Pro Asp Thr Val Gln Asp Leu Lys Ser Arg Ser Arg Gly	
515 520 525	

AAG CAG AAT CAA CAG CAG CAG GAA CAG CAG AAG CAG ATG ATG CCG 1895  
 Lys Gln Asn Gln Gln Gln Gln Glu Gln Gln Lys Gln Met Met Pro  
 530 535 540  
 CTC CAG GCC TCA ACA CAA GAG AAG AAT GGA CTT 1928  
 Leu Gln Ala Ser Thr Gln Glu Lys Asn Gly Leu  
 545 550 551  
 TGAGAACGGA AGGGCTTCAC ACAGCACTAA AGGGAGTGGG GTTCTACAGG TCCTGCCGTC 1988  
 TACATGAGGA GGGGGAGTGA GTAGAGGGAC TGGACCATCC AAATGTGGAG GCTGCCATTC 2048  
 AGAGAAATCC CTCCCCAAAG GTCATGTCAG TAGACCCACT AGGAACAAAA GCTCTGACTA 2108  
 TGTGCAGCTT CTTAAGCAGA ATGTTCTCGT CACCGGCCAT CTTCTGCTC ATGGTCACTC 2168  
 CGCCACCTCC AGGACCTTGC AAAGAATCTC AGACAATTAA ATGAATCTCT TCTAAAAAAA 2228  
 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 2288  
 AAAAAA 2294

配列番号 : 2

配列の長さ : 2171

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : ヒト

配列

GAAAGCTGAG CTGCCCTGAC CCCCAAAGTG AGGAGAAGCT GCAAGGGAAA AGGGAGGGAC 60  
 AGATCAGGGA GACCGGGGAA GAAGGAGGAG CAGCCAAGGA GGCTGCTGTC CCCCCACAGA 120  
 GCAGCTCGGA CTCAGCTCCC GGAGCAACCC AGCTGCGGAG GCAACGGCAG TGCTGCTCCT 180

CCAGCGAAGG ACAGCAGGCA GGCAGACAGA CAGAGGTCCT GGGACTGGAA GGCCTCAGCC	240
CCCAGCCACT GGGCTGGGCC TGGCCCA	267
ATG GCC TTT AAT GAC CTC CTG CAG CAG GTG GGG GGT GTC GGC CGC	312
Met Ala Phe Asn Asp Leu Leu Gln Gln Val Gly Gly Val Gly Arg	
1 5 10 15	
TTC CAG CAG ATC CAG GTC ACC CTG GTG GTC CTC CCC CTG CTC CTG	357
Phe Gln Gln Ile Gln Val Thr Leu Val Val Leu Pro Leu Leu Leu	
20 25 30	
ATG GCT TCT CAC AAC ACC CTG CAG AAC TTC ACT GCT GCC ATC CCT	402
Met Ala Ser His Asn Thr Leu Gln Asn Phe Thr Ala Ala Ile Pro	
35 40 45	
ACC CAC CAC TGC CGC CCG CCT GCC GAT GCC AAC CTC AGC AAG AAC	447
Thr His His Cys Gly Pro Pro Ala Asp Ala Asn Leu Ser Lys Asn	
50 55 60	
GGG GGG CTG GAG GTC TGG CTG CCC CGG GAC AGG CAG GGG CAG CCT	492
Gly Gly Leu Glu Val Trp Leu Pro Arg Asp Arg Gln Gly Gln Pro	
65 70 75	
GAG TCC TGC CTC CGC TTC ACC TCC CCG CAG TGG GGA CTG CCC TTT	537
Glu Ser Cys Leu Arg Phe Thr Ser Pro Gln Trp Gly Leu Pro Phe	
80 85 90	
CTC AAT GGC ACA GAA GCC AAT GGC ACA GGG GCC ACA GAG CCC TGC	582
Leu Asn Gly Thr Glu Ala Asn Gly Thr Gly Ala Thr Glu Pro Cys	
95 100 105	



ACC GAT GGC TGG ATC TAT GAC AAC AGC ACC TTC CCA TCT ACC ATC	627
Thr Asp Gly Trp Ile Tyr Asp Asn Ser Thr Phe Pro Ser Thr Ile	
110 115 120	
GTG ACT GAG TGG GAC CTT GTG TGC TCT CAC AGG GCC CTA CGC CAG	672
Val Thr Glu Trp Asp Leu Val Cys Ser His Arg Ala Leu Arg Gln	
125 130 135	
CTG GCC CAG TCC TTG TAC ATG GTG GGG GTG CTG CTC GGA GCC ATG	717
Leu Ala Gln Ser Leu Tyr Met Val Gly Val Leu Leu Gly Ala Met	
140 145 150	
GTG TTC GGC TAC CTT GCA GAC AGG CTA GGC CGC CGG AAG GTA CTC	762
Val Phe Gly Tyr Leu Ala Asp Arg Leu Gly Arg Arg Lys Val Leu	
155 160 165	
ATC TTG AAC TAC CTG CAG ACA GCT GTG TCA GGG ACC TGC GCA GCC	807
Ile Leu Asn Tyr Leu Gln Thr Ala Val Ser Gly Thr Cys Ala Arg	
170 175 180	
TTC GCA CCC AAC TTC CCC ATC TAC TGC GCC TTC CGG CTC CTC TCG	852
Phe Ala Pro Asn Phe Pro Ile Tyr Cys Ala Phe Arg Leu Leu Ser	
185 190 195	
GGC ATG GCT CTG GCT GGC ATC TCC CTC AAC TGC ATG ACA CTG AAT	897
Gly Met Ala Leu Ala Gly Ile Ser Leu Asn Cys Met Thr Leu Asn	
200 205 210	
GTG GAG TGG ATG CCC ATT CAC ACA CGG GCC TGC GTG GGC ACC TTG	942
Val Glu Trp Met Pro Ile His Thr Arg Ala Cys Val Gly Thr Leu	
215 220 225	

ATT GGC TAT GTC TAC AGC CTG GGC CAG TTC CTC CTG GCT GGT GTG	987
Ile Gly Tyr Val Tyr Ser Leu Gly Gln Phe Leu Leu Ala Gly Val	
230 235 240	
GCC TAC GCT GTG CCC CAC TGG CGC CAC CTG CAG CTA CTG GTC TCT	1032
Ala Tyr Ala Val Pro His Trp Arg His Leu Gln Leu Leu Val Ser	
245 250 255	
GCG CCT TTT TTT GCC TTC TTC ATC TAC TCC TGG TTC TTC ATT GAG	1077
Ala Pro Phe Phe Ala Phe Phe Ile Tyr Ser Trp Phe Phe Ile Glu	
260 265 270	
TCG GCC CGC TGG CAC TCC TCC TCC GGG AGG CTG GAC CTC ACC CTG	1122
Ser Ala Arg Trp His Ser Ser Ser Gly Arg Leu Asp Leu Thr Leu	
275 280 285	
AGG GCC CTG CAG AGA GTC GCC CGG ATC AAT GGG AAG CGG GAA GAA	1167
Arg Ala Leu Gln Arg Val Ala Arg Ile Asn Gly Lys Arg Glu Glu	
290 295 300	
GGA GCC AAA TTG AGT ATG GAG GTA CTC CGG GCC AGT CTG CAG AAG	1212
Gly Ala Lys Leu Ser Met Glu Val Leu Arg Ala Ser Leu Gln Lys	
305 310 315	
GAG CTG ACC ATG GGC AAA GGC CAG GCA TCG GCC ATG GAG CTG CTG	1257
Glu Leu Thr Met Gly Lys Gly Gln Ala Ser Ala Met Glu Leu Leu	
320 325 330	
CGC TGC CCC ACC CTC CGC CAC CTC TTC CTC TGC CTC TCC ATG CTG	1302
Arg Cys Pro Thr Leu Arg His Leu Phe Leu Cys Leu Ser Met Leu	
335 340 345	

TGG TTT GCC ACT AGC TTT GCA TAC TAT GGG CTG GTC ATG GAC CTG	1347
Trp Phe Ala Thr Ser Phe Ala Tyr Tyr Gly Leu Val Met Asp Leu	
350 355 360	
CAG GGC TTT GGA GTC AGC ATC TAC CTA ATC CAG GTG ATC TTT GGT	1392
Gln Gly Phe Gly Val Ser Ile Tyr Leu Ile Gln Val Ile Phe Gly	
365 370 375	
GCT GTG GAC CTG CCT GCC AAG CTT GTG GGC TTC CTT GTC ATC AAC	1437
Ala Val Asp Leu Pro Ala Lys Leu Val Gly Phe Leu Val Ile Asn	
380 385 390	
TCC CTG GGT CGC CGG CCT GCC CAG ATG GCT GCA CTG CTG CTG GCA	1482
Ser Leu Gly Arg Arg Pro Ala Gln Met Ala Ala Leu Leu Leu Ala	
395 400 405	
GGC ATC TGC ATC CTG CTC AAT GGG GTG ATA CCC CAG GAC CAG TCC	1527
Gly Ile Cys Ile Leu Leu Asn Gly Val Ile Pro Gln Asp Gln Ser	
410 415 420	
ATT GTC CGA ACC TCT CTT GCT GTG CTG GGG AAG GGT TGT CTG GCT	1572
Ile Val Arg Thr Ser Leu Ala Val Leu Gly Lys Gly Cys Leu Ala	
425 430 435	
GCC TCC TTC AAC TGC ATC TTC CTG TAT ACT GGG GAA CTG TAT CCC	1617
Ala Ser Phe Asn Cys Ile Phe Leu Tyr Thr Gly Glu Leu Tyr Pro	
440 445 450	
ACA ATG ATC CGG CAG ACA GGC ATG GGA ATG GGC AGC ACC ATG GCC	1662
Thr Met Ile Arg Gln Thr Gly Met Gly Met Gly Ser Thr Met Ala	
455 460 465	

CGA GTG GGC AGC ATC GTG AGC CCA CTG GTG AGC ATG ACT GCC GAG -	1707
Arg Val Gly Ser Ile Val Ser Pro Leu Val Ser Met Thr Ala Glu	
470 475 480	
CTC TAC CCC TCC ATG CCT CTC TTC ATC TAC GGT GCT GTT CCT GTG	1752
Leu Tyr Pro Ser Met Pro Leu Phe Ile Tyr Gly Ala Val Pro Val	
485 490 495	
GCC GCC AGC GCT GTC ACT GTC CTC CTG CCA GAG ACC CTG GGC CAG	1797
Ala Ala Ser Ala Val Thr Val Leu Leu Pro Glu Thr Leu Gly Gln	
500 505 510	
CCA CTG CCA GAC ACG GTG CAG GAC CTG GAG AGC AGG TGG GCC CCC	1842
Pro Leu Pro Asp Thr Val Gln Asp Leu Glu Ser Arg Trp Ala Pro	
515 520 525	
ACT CAG AAA GAA GCA GGG ATA TAT CCC AGG AAA GGG AAA CAG ACG	1887
Thr Gln Lys Glu Ala Gly Ile Tyr Pro Arg Lys Gly Lys Gln Thr	
530 535 540	
CGA CAG CAA CAA GAG CAC CAG AAG TAT ATG GTC CCA CTG CAG GCC	1932
Arg Gln Gln Gln Glu His Gln Lys Tyr Met Val Pro Leu Gln Ala	
545 550 555	
TCA GCA CAA GAG AAG AAT GGA CTC	1956
Ser Ala Gln Glu Lys Asn Gly Leu	
560 563	
TGAGGACTGA GAAGGGGCCT TACAGAACCC TAAAGGGAGG GAAGGTCCTA CAGGTCTCCG	2016
GCCACCCACA CAAGGAGGAG GAAGAGGAAA TGGTGACCCA AGTGTGGGGG TTGTGGTTCA	2076
GGAAAGCATC TTCCAGGGG TCCACCTCCC TTTATAAACC CCACCAGAAC CACATCATTA	2136
AAAGGTTTGA CTGCGAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA	2171

## 請 求 の 範 囲

1. 以下の(A)、(B)、(C)および(D)から選択されるタンパク質。
  - (A)配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。
  - 5 (B)配列番号1で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ有機陰イオンを輸送する能力を有するタンパク質。
  - (C)配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。
  - (D)配列番号2で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ有機
  - 10 陰イオンを輸送する能力を有するタンパク質。
2. ヒト由来である請求項1記載のタンパク質。
3. ラット由来である請求項1記載のタンパク質。
4. 腎臓組織由来である請求項1記載のタンパク質。
- 15 5. 請求項1記載のタンパク質をコードする遺伝子。
6. 以下の(a)、(b)、(c)および(d)から選択されるDNAからなる遺伝子。
  - (a)配列番号1で示される塩基配列からなるDNA。
  - (b)配列番号1で示される塩基配列からなるDNAとストリンジェント
  - 20 な条件下でハイブリダイズし、かつ有機陰イオンを輸送する能力を有するタンパク質をコードするDNA。
  - (c)配列番号2で示される塩基配列からなるDNA。
  - (d)配列番号2で示される塩基配列からなるDNAとストリンジェント
  - 25 な条件下でハイブリダイズし、かつ有機陰イオンを輸送する能力を有するタンパク質をコードするDNA。

7. ヒト由来である請求項 6 記載の遺伝子。
8. ラット由来である請求項 6 記載の遺伝子。
9. 腎臓組織由来である請求項 6 記載の遺伝子。
10. 請求項 5～9 のいずれかの項に記載の遺伝子もしくは該遺伝子  
5 中のタンパク質をコードする領域を含むプラスミド。
11. 発現プラスミドである請求項 10 記載のプラスミド。
12. 請求項 10 記載のプラスミドで形質転換された宿主細胞。
13. 配列番号 1 または 2 で示される塩基配列の中の連続する 14 塩  
基以上の部分配列もしくはその相補的な配列を含むヌクレオチド。
- 10 14. 有機陰イオンを輸送する能力を有するタンパク質をコードする  
遺伝子を検出するためのプローブとして使用するものである請求項 13  
記載のヌクレオチド。
- 15 15. 有機陰イオンを輸送する能力を有するタンパク質をコードする  
遺伝子の発現を変調させるために使用するものである請求項 13 記載の  
ヌクレオチド。
16. 請求項 1～4 のいずれかの項に記載のタンパク質に対する抗体。
17. 請求項 1～4 のいずれかの項に記載のタンパク質を用いて、該  
タンパク質の有する有機陰イオンを輸送する能力に対する被検物質の基質  
としての作用を検定する方法。

図 1

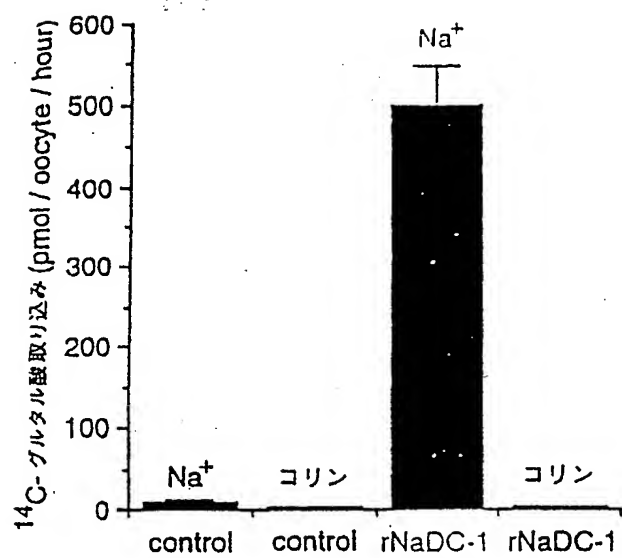


図 2

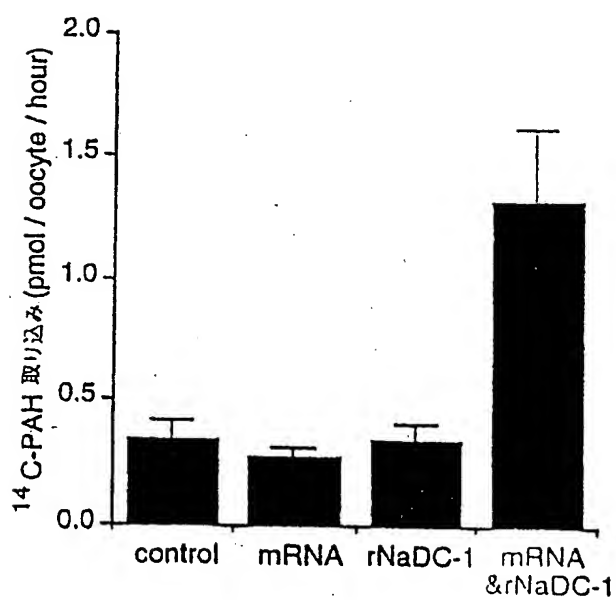


図 3

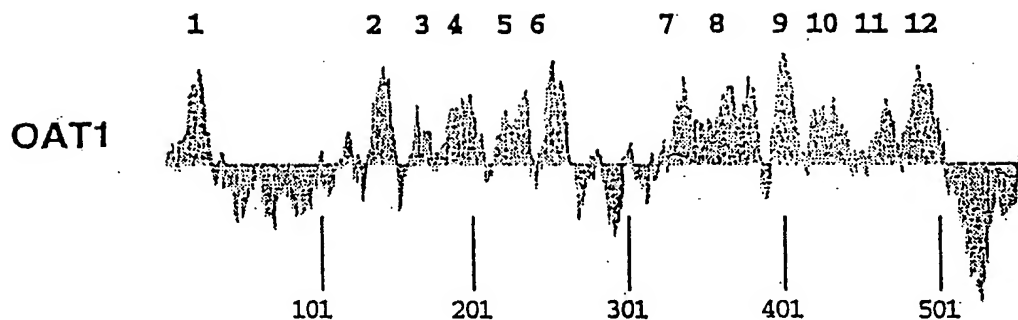


図 4

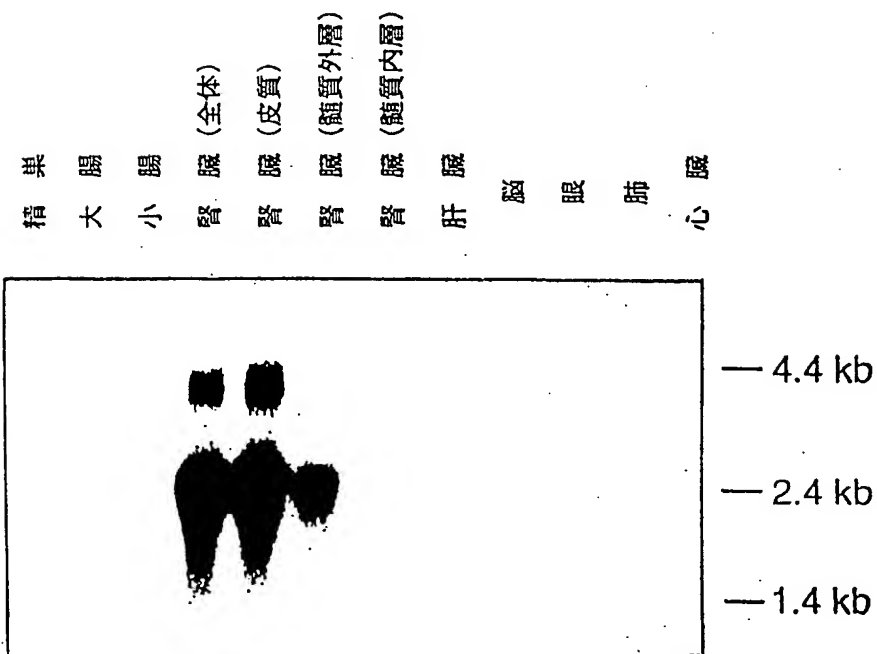




図 5

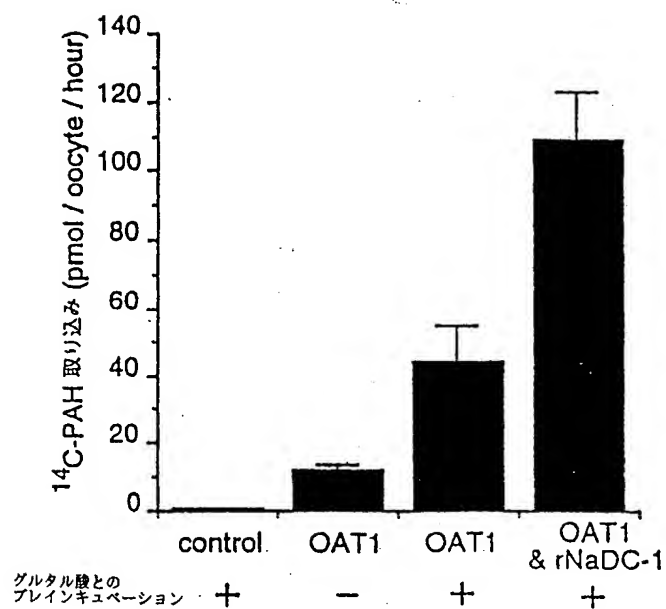


図 6

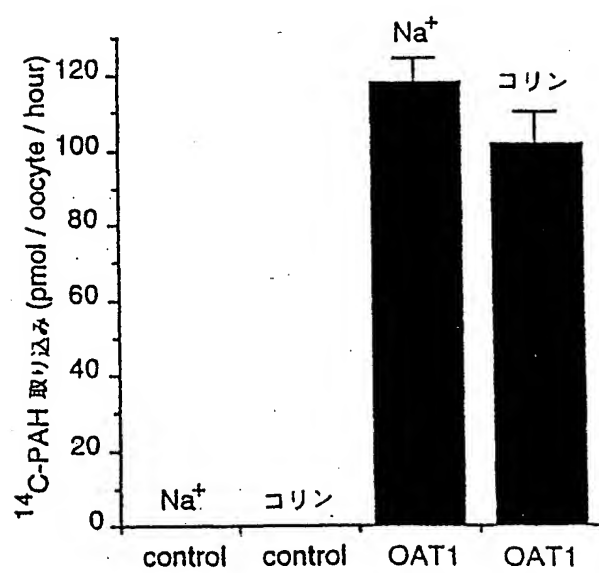


図 7

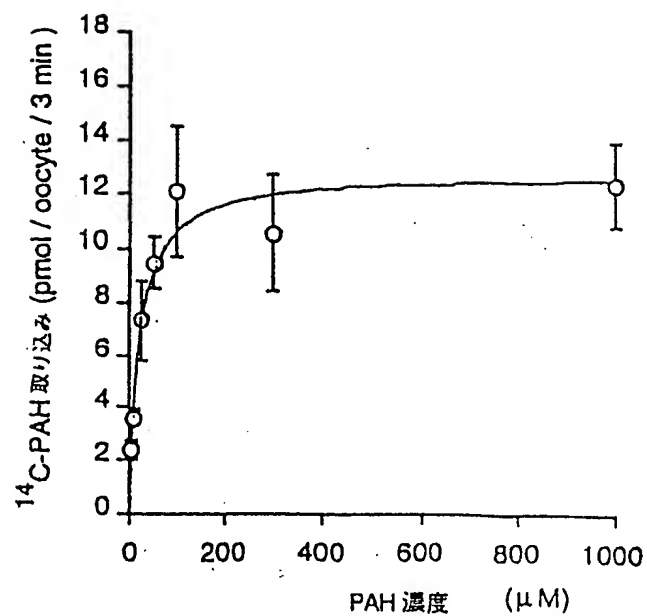


図 8

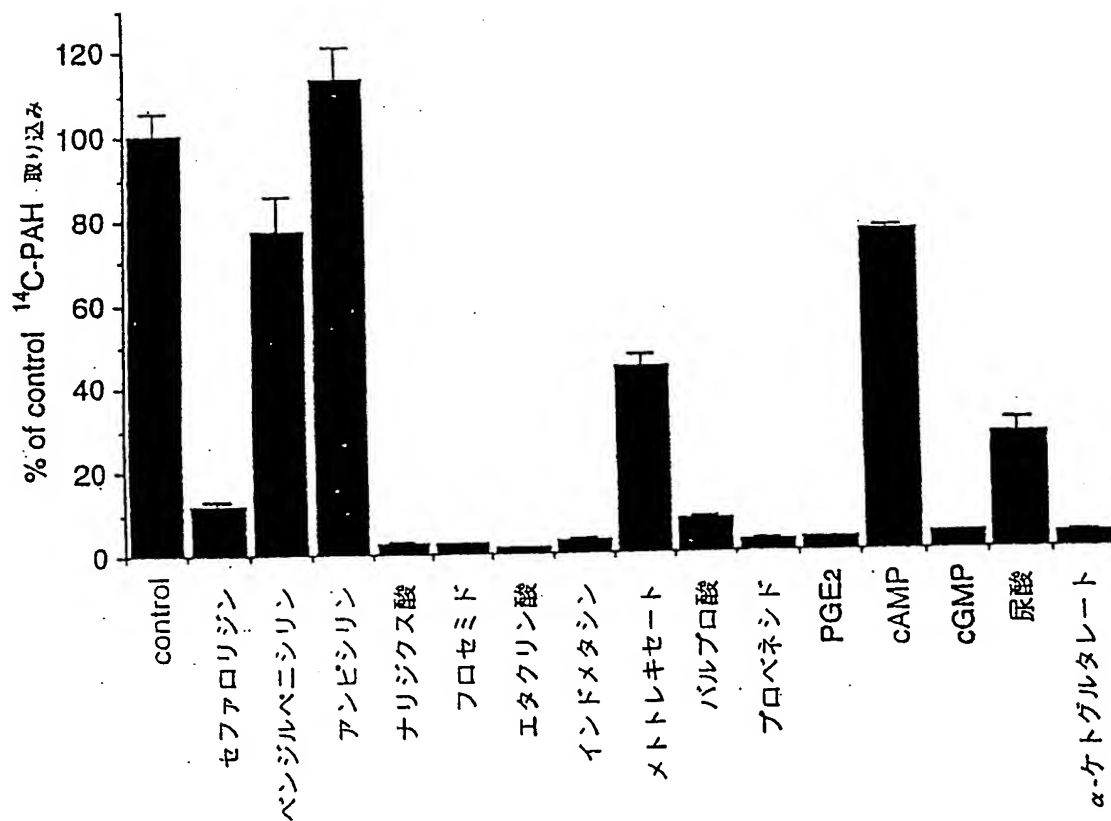
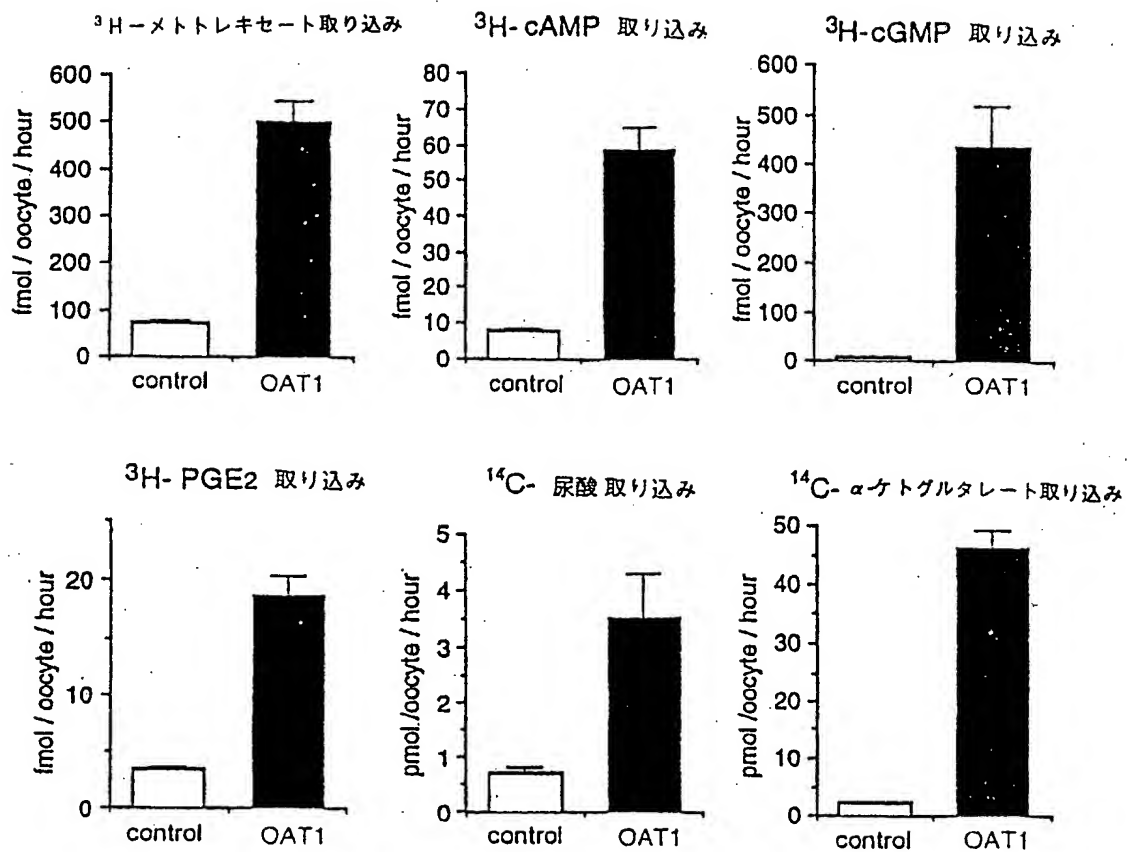


図 9



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02171

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.C1<sup>6</sup> C12N15/12, 15/63, C07K14/47, 16/18, C12Q1/68, C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1<sup>6</sup> C12N15/12, 15/63, C07K14/47, 16/18, C12Q1/68, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Lopez-Nieto, C.E., et al., "Molecular cloning and characterization of NKT, a gene product related to the organic cation transporter family that is almost exclusively expressed in the kidney", The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, No. 10 (07. 03. 1997), pp. 6471-6478	1-17
X A	Adams, M.D., et al., "Rapid cDNA sequencing (expressed sequence tags) from a directionally cloned human infant brain cDNA library", Nature Genetics, Vol. 4, No. 4 (1993), pp.373-380	1-16 17
X A	Adams, M.D., et al., "Complementary DNA Sequencing: Expressed Sequence Tags and Human Genome Project", Science, Vol. 252, No. 5013 (1991), pp.1651-1656	1-16 17
X A	Adams, M.D., et al., "Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence", Nature, Vol. 377, No. 6547 Suppl. (1995), pp.3-174	1-16 17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

 Date of the actual completion of the international search  
 August 7, 1998 (07. 08. 98)

 Date of mailing of the international search report  
 August 18, 1998 (18. 08. 98)

 Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02171

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	DDBJ, LOCUS; AA269606 514bp mRNA EST 26-MAR-1997, ACCESSION; AA269606, Marra, M., et al., "DEFINITION va61f06. r1 Soares mouse 3NME12 5 Mus musculus cDNA clone 735875 5' similar to TR:G1293672 G1293672 KIDNEY-SPECIFIC TRANSPORT PROTEIN.;, mRNA sequence".	1-16 17
X A	DDBJ, LOCUS; AA124333 501bp mRNA EST 13-FEB-1997, ACCESSION; AA124333, Marra, M., et al. "DEFINITION mq28a09.r1 Barstead MPLRB1 Mus musculus cDNA clone 580024 5' similar to TR:G1293672 G1293672 KIDNEY-SPECIFIC TRANSPORT PROTEIN;;, mRNA sequence".	1-16 17
X A	DDBJ, LOCUS; W34761 368bp mRNA EST 13-MAY-1996, ACCESSION; W34761, Marra, M., et al., "DEFINITION mc60h03.r1 Soares mouseembryo NbME13.5 14.5 Mus musculus cDNA clone 35249.5', mRNA sequence".	1-16 17
X A	DDBJ, LOCUS; R25797 430 bp mRNA EST 24-APR-1995, ACCESSION; R25797, Hillier, L., et al., "DEFINITION yg54b04.r1 Soares infant brain 1NIB Homo sapiens cDNA clone 36482 5', mRNA sequence".	1-16 17
X A	DDBJ, LOCUS; R46796 396bp mRNA EST 22-MAY-1995, ACCESSION; R46797, Hillier, L., et al., "DEFINITION yg54b04.s1 Soares infant brain 1NIB Homo sapiens cDNA clone 36482 5', mRNA sequence".	1-16 17
P, X	Sekine, T., et al., "Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter". The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, No. 30 (25. 07. 1997), pp.18526-18529	1-17
P, X	Wolff, N.A., et al., "Expression cloning and characterization of a renal organic anion transporter from winter flounder". FEBS Letters, Vol. 417, No. 3 (17. 11. 1997), pp.287-291	1-17
P, X	Sweet, D.H., et al., "Expression cloning and characterization of ROAT1. The basolateral organic anion transporter in rat kidney". The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, No. 48 (28. 11. 1997), pp.30088-30095	1-17
P, X P, Y	Mori, K., et al., "Kidney-specific expression of a novel mouse organic cation transporter-like protein". FEBS Letters, Vol. 417, No. 3 (17. 11. 1997), pp.371-374	1-16 17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>8</sup> C12N15/12, 15/63, C07K14/47, 16/18, C12Q1/68, C12P21/08		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>8</sup> C12N15/12, 15/63, C07K14/47, 16/18, C12Q1/68, C12P21/08		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq SwissProt/PIR/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Lopez-Nieto, C. E., et al. "Molecular cloning and characterization of NKT, a gene product related to the organic cation transporter family that is almost exclusively expressed in the kidney", The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, No. 10 (07. 03. 1997), pp. 6471-6478	1-17
X A	Adams, M. D., et al. "Rapid cDNA sequencing (expressed sequence tags) from a directionally cloned human infant brain cDNA library", Nature Genetics, Vol. 4, No. 4 (1993), pp. 373-380	1-16 17
X A	Adams, M. D., et al. "Complementary DNA Sequencing: Expressed Sequence Tags and Human Genome Project", Science, Vol. 252, No.	1-16 17
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 07. 08. 98	国際調査報告の発送日 18.08.98	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 村上 騎見高 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	5013(1991), pp. 1651-1656	
X A	Adams, M. D., et al. "Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence", Nature, Vol. 377, No. 6547 Suppl. (1995), pp. 3-174	1-16 17
X A	DDBJ, LOCUS; AA269606 514bp mRNA EST 26-MAR-1997, ACCESSION; AA269606, Marra, M., et al. "DEFINITION va61f06.r1 Soares mouse 3NME12 5 Mus musculus cDNA clone 735875 5' similar to TR:G1293672 G1293672 KIDNEY-SPECIFIC TRANSPORT PROTEIN. ; , mRNA sequence."	1-16 17
X A	DDBJ, LOCUS; AA124333 501bp mRNA EST 13-FEB-1997, ACCESSION; AA124333, Marra, M., et al. "DEFINITION mq28a09.r1 Barstead MPLRB1 Mus musculus cDNA clone 580024 5' similar to TR:G1293672 G1293672 KIDNEY-SPECIFIC TRANSPORT PROTEIN. ; , mRNA sequence."	1-16 17
X A	DDBJ, LOCUS; W34761 368bp mRNA EST 13-MAY-1996, ACCESSION; W34761, Marra, M., et al. "DEFINITION mc60h03.r1 Soares mouse embryo NbME13.5 14.5 Mus musculus cDNA clone 35249.5', mRNA sequence."	1-16 17
X A	DDBJ, LOCUS; R25797 430bp mRNA EST 24-APR-1995, ACCESSION; R25797, Hillier, L., et al. "DEFINITION yg54b04.r1 Soares infant brain 1NIB Homo sapiens cDNA clone 36482 5', mRNA sequence."	1-16 17
X A	DDBJ, LOCUS; R46796 396bp mRNA EST 22-MAY-1995, ACCESSION; R46797, Hillier, L., et al. "DEFINITION yg54b04.s1 Soares infant brain 1NIB Homo sapiens cDNA clone 36482 5', mRNA sequence."	1-16 17
P, X	Sekine, T., et al. "Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter.", The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, No. 30 (25. 07. 1997), pp. 18526-18529	1-17
P, X	Wolff, N. A., et al. "Expression cloning and characterization of a renal organic anion transporter from winter flounder.", FEBS Letters, Vol. 417, No. 3 (17. 11. 1997), pp. 287-291	1-17
P, X	Sweet, D. H., et al. "Expression cloning and characterization of ROAT1. The basolateral organic anion transporter in rat kidney.", The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, No. 48 (28. 11. 1997), pp. 30088-30095	1-17
P, X P, Y	Mori, K., et al. "Kidney-specific expression of a novel mouse organic cation transporter-like protein.", FEBS Letters, Vol. 417, No. 3 (17. 11. 1997), pp. 371-374	1-16 17

